

Chemische und molekularbiologische Studien am Psymberin-Gencluster

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Sarah Frank

aus Schwäbisch Gmünd

Bonn 2014

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Gutachter:

1. Prof. Dr. Jörn Piel
2. Prof. Dr. Menche
3. Prof. Dr. Baltruschat
4. Prof. Dr. König

Tag der Promotion: 05.12.2014

Erscheinungsjahr: 2014

Für meine Oma.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. Jörn Piel angefertigt.

Insbesondere gilt mein Dank Prof. Dr. Jörn Piel, der mir die Gelegenheit gab, die vorliegende Arbeit anzufertigen. Ich konnte zahlreiche neue Methoden und Arbeitstechniken, vor allem auf dem Gebiet der Molekularbiologie, erlernen und meine bereits vorhandenen Fähigkeiten in die Arbeitsgruppe einbringen.

Mein weiterer Dank gilt den Professoren der Prüfungskommission für die Übernahme der Gutachten dieser Arbeit

Der NMR-Abteilung und der Abteilung für Massenanalytik des Kekulé-Instituts danke ich für die Messungen und die Unterstützung bei Spezialmessungen, insbesondere möchte ich hier Herr Claus Schmidt, Frau Karin Peters-Pflaumbaum und Frau Christine Sondag danken.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreis Piel sowie des Arbeitskreises Gulder danke ich für die tolle Zusammenarbeit, den Gedankenaustausch und das gute Arbeitsklima. Insbesondere hervorheben möchte ich an dieser Stelle Petra Karbaum, Dr. Christoph Kohlhaas, Dr. Max Crüsemann, Frank Eggert, Fritz Schäfers und Rene Richarz.

Für das Korrekturlesen der Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Christoph Kohlhaas, Petra Karbaum, Fritz Schäfers, Dr. Mike Freeman sowie Rene Richarz bedanken.

Ich danke Matthew Jenner für die produktive Zusammenarbeit an dem Ketosynthase-Projekt.

Ganz speziell und im Besonderen möchte ich mich bei Petra Karbaum und Theresia Weber für unsere ewigen tollen Abende und die schöne Zeit bedanken- die Besten bleiben für immer!

Ich danke meinen Eltern, Susanne und Hans Frank, meiner Schwester Katharina Frank, meiner Tante Birgit Striebel sowie meinem Großvater Helmut Striebel für die immerwährende Unterstützung und den Rückhalt während dieser Zeit.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis	XVII
Abkürzungen.....	XVIII
Zusammenfassung.....	1
Abstract	6
1. Einleitung.....	11
1.1 Polyketide.....	11
1.1.1 Biosynthese von Polyketiden.....	12
1.1.2 Bindungsknüpfung in Polyketidsynthasen	12
1.1.3 Arten von Polyketidsynthasen	16
1.1.4 Strukturen von Polyketidsynthasen	20
1.1.5 <i>Trans</i> -AT Polyketidsynthasen	21
1.2 Nichtribosomale Peptidsynthetasen	22
1.2.1 NRPS-PKS Hybride	25
1.3 Beispiele von für diese Arbeit wichtigen Naturstoffen und deren Biosynthese	26
1.3.1 Psymberin (27) und dessen Biosynthese	26
1.3.2 Pederin (28) und dessen Biosynthese	32
1.3.3 Hormaomycin (32) und dessen Biosynthese	34
1.3.4 Coralloporyonin A (33) und dessen Biosynthese	36
1.3.5 Bacillaen (34) und dessen Biosynthese	38
1.4 Aufklärung von Biosynthesewegen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	39
2. Zielsetzung.....	41
2.1 Untersuchungen der Substratspezifität von <i>trans</i> -AT-KS-Domänen.....	41

2.2 Untersuchungen der putativen <i>O</i> -Methyltransferase PsyD(<i>O</i> -MT) und der putativen α -Hydroxylasen PsyC und PsyK aus der Psymberin-PKS.....	43
2.3 Synthese der Testsubstrate für Untersuchungen an der Pederin PS-Domäne.....	45
2.4 Synthese eines Intermediates für Untersuchungen von HrmI und HrmJ aus der Hormaomycin-NRPS	46
2.5 Synthese eines Intermediats für Untersuchungen von CorB aus der Corallopyronin A-PKS/NRPS.....	47
3. Ergebnisse und Diskussion	49
3.1 Studien zur Substratspezifität in <i>trans</i> -AT PKS	49
3.1.1 Methode	49
3.1.2 Synthese der Thioester 36-42	51
3.1.3 Expression der KS-Domänen aus dem Psymberin-Gencluster	54
3.1.4 Assays zur Überprüfung der Enzymaktivität der KS1-3	64
3.2 Untersuchungen der putativen <i>O</i> -Methyltransferase PsyD(<i>O</i> -MT) und der putativen α -Hydroxylasen PsyC und PsyK aus der Psymberin-PKS.....	75
3.2.1 Synthese des Standards 44b für Untersuchungen an PsyD(<i>O</i> -MT)	75
3.2.2 Synthese der Testsubstrate 45a und 45b für Untersuchungen an PsyC	80
3.2.3 Stabilitätstest der Proteine PsyD(<i>O</i> -MT) und PsyC	88
3.2.4 Assays zur Überprüfung der Enzymaktivität von PsyD(<i>O</i> -MT), PsyC und PsyK.....	90
3.3 Untersuchungen der putativen PS-Domäne aus der Pederin-PKS.....	101
3.3.1 Synthese des Testsubstrats 46 und des Teststandards 47	102
3.3.2 Assay zur Überprüfung der Enzymaktivität der Pederin-PS-Domäne	104
3.4 Synthese eines Intermediates für Untersuchungen von HrmI und HrmJ aus der Hormaomycin-PKS	107
3.5 Synthese eines Intermediats für Untersuchungen von CorB aus der Corallopyronin A-PKS/NRPS.....	114
3.6 Zusammenfassung und Ausblick	117

4. Experimenteller Teil	119
4.1 Material und Methoden	119
4.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel	119
4.1.2 Kernresonanzspektroskopie	119
4.1.3 Massenspektrometrie	120
4.1.4 Infrarotspektroskopie	120
4.1.5 Dünnschichtchromatographie	120
4.1.6 Säulenchromatographie	121
4.1.7 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	121
4.1.8 HPLC-HRMS	121
4.1.9 Allgemeine Arbeitsmethoden	122
4.2 Chemische Arbeiten	122
4.2.1 Synthese der Substrate 36-42 für die KS-Regionen	122
4.2.2 Synthese von (3 <i>S</i>)-3-Methoxy-5-methylhex-5-en-säureacetamidoethylthioester (44b)	129
4.2.3 Synthese von <i>S</i> -(2-Acetamidoethyl)-2-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-2-hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5 enamido)-ethanthioat (45b) und versuchte Synthese von <i>S</i> -(2-Acetamidoethyl)-2-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-2,3-dihydroxy-5-methylhex-5 enamido)-ethanthioat (45a)	134
4.2.4 Synthese von (<i>E</i>)- <i>S</i> -(2-Acetamidoethyl)-7-hydroxyhept-2-enthioat (46) und <i>S</i> -(2-Acetamidoethyl)-2-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)ethanthioat (47)	158
4.2.5 Versuchte Synthese von (<i>E</i>)-2-((2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-4-Amino-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)acetaldehydoxim (53)	161
4.2.6 Synthese von <i>S</i> -(2-Acetamidoethyl)-3-oxododecanthioat (55)	169
4.3 Molekularbiologischer Teil	173
4.3.1 Medien und Puffer	173
4.3.2 Bakterienstämme	175
4.3.3 Primer	175

4.3.4 Vektoren	176
4.3.5 Konstrukte	176
4.3.6 Plasmidisolation durch alkalische Lyse.....	176
4.3.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)	177
4.3.8 Kolonie PCR.....	179
4.3.9 Agarosegelelektrophorese	180
4.3.10 Gelextraktion mittels QIAgen Gel Extraction Kit.....	180
4.3.11 Enzymatische Modifizierung von DNA	181
4.3.12 Transfermethode für DNA: Elektroporation	182
4.3.13 SDS-PAGE	183
4.3.14 Proteinexpression.....	184
4.3.15 Proteinassays	188
4.4 Geräteliste	191
5. Literatur.....	193
6. Anhang.....	205
6.1 NMR-Spektren	205
6.2 Vektoren und Konstrukte	236
7. Publikationen	240

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturen von Polyketiden; Erythromycin A (1), Actinorhodin (2), Epothilon C (3), Lovastatin (4) und Rapamycin (5).	11
Abbildung 2: Bildung des CoA-Esters 10.	13
Abbildung 3: Bausteine der PKS-Biosynthese 11–17.	13
Abbildung 4: Aktivierung der ACP mittels Phosphopantetheinyl.	14
Abbildung 5: Claisen-artige Bindungsknüpfung in Polyketidsynthasen; geschlängelte Linie: 5'-Phosphopantetheinylarm.	14
Abbildung 6: a) Die Polyketidkette wird vom ACP auf die KS des nächsten Moduls übertragen; b) die AT wählt eine Verlängerungseinheit aus und überträgt diese auf das ACP; c) die KS katalysiert die Verknüpfung der beiden Moleküle; d) das entstandene Molekül durchläuft die optionalen Reduktionsschritte; e) die um eine Einheit verlängerte Kette wird auf die KS des nächsten Moduls übertragen; die Reaktionspfeile deuten in Richtung der Bewegung der wachsenden Kette und stehen nicht für Elektronenbewegungen. ³	15
Abbildung 7: Post-PKS-Funktionen.	15
Abbildung 8: Putative Funktion der Pyransynthase; n = 0,1; die PS katalysiert eine Ringschlussreaktion zum Lacton.	16
Abbildung 9: Klassifizierung der PKS.	16
Abbildung 10: Biosyntheseweg des Erythromycin A (1).	18
Abbildung 11: Beispiel einer iterativen Typ I PKS an der Lovastatin (4)-Biosynthese.	19
Abbildung 12: Funktion einer Typ II-PKS am Beispiel von Daunorubicin (21).	19
Abbildung 13: Typ III-Polyketidsynthase am Beispiel des Naringeninichalcons (22).	20
Abbildung 14: Doppelhelix der PKS.	21
Abbildung 15: Ausschnitt aus einem PKS-Gencluster zur Verdeutlichung des Unterschiedes zwischen <i>cis</i> - und <i>trans</i> -AT-PKS.	21
Abbildung 16: Medizinisch relevante NRPS-Produkte; Cyclosporin A (23), Daptomycin (24) und Echinomycin (25).	23
Abbildung 17: Durch die A-Domäne katalysierte Bindungsbildung zwischen ATP und Aminosäure; die Carboxylgruppe der Aminosäure wird als Aminoacyl-AMP aktiviert.	23
Abbildung 18: Funktion der PCP-Domäne; Verknüpfung mit der Aminosäure durch nukleophilen Angriff der Thiolgruppe.	24
Abbildung 19: Die Kondensationsdomäne katalysiert die Bindungsknüpfung zwischen zwei Substraten.	24
Abbildung 20: Abspaltung der Kette von der NRPS durch die TE-Domäne, das Polyketid kann als offenkettige Säure oder durch Makrocyclisierung freigesetzt werden.	25

Abbildung 21: Struktur von Bleomycin (26), Produkt eines PKS-NRPS-Hybrid-Genclusters.	26
Abbildung 22: a) <i>Ircinia oros</i> (naher Verwandter von <i>Ircinia ramosa</i>) ⁵⁴ ; b) <i>Psammocinia</i> aff. <i>bulbosa</i> ⁵⁵	27
Abbildung 23: Struktur von Psymberin (27).	27
Abbildung 24: Strukturen von Pederin (28) und Onnamid A (29).	28
Abbildung 25: Psymberin-Biosynthese durch einen PKS-NRPS-Hybrid; GNAT: ist verwandt mit der GCN5 Familie; CR: Crotonase; KS ⁰ : nicht-elongative KS; O-MT: O-Methyltransferase; MT: Methyltransferase; ?: unbekannt.....	30
Abbildung 26: Überblick über die Gene des Genclusters von Psymberin, markiert: ungewöhnliche Gene, die die Proteine PsyD, PsyC und PsyK codieren.	30
Abbildung 27: Ausschnitt aus der Biosynthese von Psymberin (27): PsyC/PsyK: putative α -Hydroxylasen, PsyD(O-MT): putative O-Methyltransferase.	31
Abbildung 28: Postulierte Funktion des Proteins PsyD(O-MT); R: -H oder -OH.	31
Abbildung 29: Putative Funktionen der Proteine PsyC und PsyK; R: -OH oder -OMe.....	32
Abbildung 30: Putative Biosynthese von Pederin (28) durch einen PKS-NRPS-Hybrid. Zur Bildung des Endproduktes existieren zwei hypothetische Wege. 1: Biosynthese bis zum Intermediat von Modul PedF mit anschließender oxidativer Spaltung in einer Bayer-Villiger Oxidation durch PedG (FAD-abhängige Monooxygenase) zu 31 . 2: Komplette Biosynthese über PedH zu 30 mit anschließender oxidativer Spaltung in einer Bayer-Villiger Oxidation durch PedG (FAD-abhängige Monooxygenase) zu 31 und dann Umwandlung in Pederin (28).	34
Abbildung 31: Struktur von Hormaomycin (32).	35
Abbildung 32: Hormaomycin (32)–Biosynthese durch eine NRPS; blaue Domänen: PCP-Domänen; rosa Domänen: Condensations-Domänen; grüne Domänen: Adenylierungsdomänen, pinke Domäne: Thioesterase.	36
Abbildung 33: Struktur von Corallopyronin A (33).	36
Abbildung 34: Corallopyronin A-Biosynthese durch einen PKS-NRPS-Gencluster; hellgrüne Domänen: ACP-Domänen.....	37
Abbildung 35: Struktur von Bacillaen (34).	38
Abbildung 36: Biosyntheseweg von Bacillaen (34) durch einen PKS-/ NRPS- Hybriden; hellgrüne Domänen: ACP-Domänen; AL: Acyl-[ACP]-Ligase.....	39
Abbildung 37: SNAC-Thioester (35) und CoA (8).	40
Abbildung 38: Ausschnitt aus der PKS von Psymberin (27), in der die ersten drei KS lokalisiert sind, und postulierte Biosynthese.	42
Abbildung 39: Darzustellende SNAC-Thioester 36-42 für die KS-Assays sowie Thioester 43 für den ACP-Assay.	43
Abbildung 40: Ungewöhnliche Proteine im Psymberin-Gencluster; O-MT: O-Methyltransferase (PsyD); PsyC/PsyK: α -Hydroxylasen.	43

Abbildung 41: Putative Funktion der <i>O</i> -Methyltransferase von PsyD; R: -H oder -OH.....	44
Abbildung 42: Putative Funktionen der Enzyme PsyC und PsyK.; R: -OH oder -OMe.....	45
Abbildung 43: Testsubstrate 44b , 45a/45b , sowie im Rahmen vorangegangener Arbeiten bereits synthetisiertes Testsubstrat 44a für die Umsetzung mit PsyC/PsyK und PsyD(<i>O</i> -MT).....	45
Abbildung 44: Modul in der Pederin-Biosynthese, in der die PS-Domäne (pink), die den Ringschluß katalysiert, lokalisiert ist.	46
Abbildung 45: Zu synthetisierende Testsubstrate 46 und 47 für den PS-Assay.	46
Abbildung 46: Putativer Biosyntheseweg von (3-Ncp)Ala (48). ¹⁰⁶	47
Abbildung 47: Intermediat 55 zur Co-Kristallisierung mit CorB.	48
Abbildung 48: Bildung des Pyronringschlusses zu 56 ; R ₁ : C ₈ H ₁₈ , R ₂ :C ₄ H ₈ NO.	48
Abbildung 49: Für den KS-Assay dargestellte SNAC-Thioester 36–43	50
Abbildung 50: Allgemeine Synthese der Thioester 36–43	51
Abbildung 51: Darstellung von <i>S</i> -(3-Methyl-3-buten)- <i>N</i> -acetylcysteamin 42	52
Abbildung 52: Darstellung der 3-Oxobutansäure 41	53
Abbildung 53: Darstellung von (<i>S</i>)-(3-Hydroxybutyl)- <i>N</i> -acetylcysteamin 41 und versuchte Oxidation.	53
Abbildung 54: Darstellung des β -Ketothioesters 41	54
Abbildung 55: Ausschnitt des Psymberin-Gencluturs mit Lage der Ketosynthasen 1–3.....	54
Abbildung 56: Klonierungsstrategie für KS1; MCS: multiple cloning site.	55
Abbildung 57: Klonierungsstrategie von KS2; MCS: multiple cloning site.....	56
Abbildung 58: Klonierungsstrategie von KS3; MCS: multiple cloning site.....	57
Abbildung 59: Agarosegel (1%) der PCR-Produkte. Die PCR-Produkte besitzen die korrekte Größe von 1410 bp, 1875 bp und 1892 bp; M: Marker.	58
Abbildung 60: Überprüfung der Konstrukte im TA-Vektor. Die Banden zeigen die richtigen Größen von 1410 bp für KS1, 1875 bp für KS2 und 1892 bp für KS3 sowie den religierten Vektor bei 5322 bp und unverdaute Konstrukte; M: Marker.....	59
Abbildung 61: Testverdau der Konstrukte für KS2 in pHis8 KS2: 1875 bp. Ebenfalls zu sehen: religierter Vektor bei 5322 bp und unverdaute Konstrukte; erfolgreich sequenziert: Konstrukt KS2-C; A-E: verschiedene Klone von KS2; M: Marker.	60
Abbildung 62: Testverdau der Konstrukte in pHis8; KS3: 1892 bp. Ebenfalls zu sehen: religierter Vektor bei 5322 bp und unverdaute Konstrukte; erfolgreich sequenziert: Konstrukt KS3-C und KS3-D; A-H: verschiedene Proben der jeweiligen KS, M: Marker.....	60
Abbildung 63: Neue Klonierungsstrategie von KS1 und KS1'; MCS:multiple cloning site; KS1: Primer KS1 <i>EcoRI</i> for-2, KS1': Primer KS1 <i>EcoRI</i> for-2'.....	61
Abbildung 64: Agarosegel (1%) der PCR-Produkte. Die PCR-Produkte besitzen die korrekte Größe von 1804 bp und 1774 bp; A: DNA 1:10 verdünnt, B: DNA unverdünnt, A/B: Primer 1,	

A'/B': Primer 2, 1-4: Temperaturgradient, 1: 50.5 °C, 2: 55.3 °C, 3: 60.7 °C, 4: 65.1 °C; M: Marker.	62
Abbildung 65: Überprüfung des Verdau der PCR-Produkte für eine Klonierung mittels eines Agarosegels (1%), die Banden zeigen das erwartete Produkt bei 1804 und 1774 bp; A1'-B1': verschiedene Proben von KS1, M: Marker.	62
Abbildung 66: Testverdau von KS1 und KS1' in pHis8. Die Banden zeigen das erwartete Produkt bei 1804 und 1774 bp; B1A-B1'b: Verschiedene Klone von KS1, M: Marker.	63
Abbildung 67: Expression von KS2 und KS3; A: Überstand, B: Pellet, C: Durchfluss, D: Waschfraktion, E: Imidazol 50 mM, F: Imidazol 100 mM, G: Imidazol 150 mM, H: Imidazol 200 mM, I: Imidazol 250 mM, M: Marker.....	63
Abbildung 68: Expression von KS1 und KS1'; A: Überstand, B: Pellet, C: Durchfluss, D: Waschfraktion, E: Imidazol 50 mM, F: Imidazol 100 mM, G: Imidazol 150 mM, H: Imidazol 200 mM, I: Imidazol 250 mM, M: Marker.....	64
Abbildung 69: Für die KS-Assays synthetisierte Thioester 36-43	65
Abbildung 70: Ausschnitt des Psymberin-Biosyntheseproteins PsyA, das KS1 enthält.	65
Abbildung 71: A: Zeitlicher Verlauf der Massenspektren beim Beladen der PsyA-KS1 mit Testsubstrat 36; B: Kinetischer Plot, der die Acylierung von PsyA-KS1 mit den unterschiedlichen Substraten verdeutlicht.	66
Abbildung 72: Ausschnitt des Psymberin-Biosyntheseproteins PsyA, das KS2 enthält.	66
Abbildung 73: A: Zeitlicher Verlauf der Massenspektren beim Beladen der PsyA-KS2 mit Substrat 42; B: Kinetischer Plot, der die Acylierung von PsyA-KS2 mit den unterschiedlichen Substraten verdeutlicht.	67
Abbildung 74: Ausschnitt des Psymberin-Biosyntheseproteins PsyD, das KS3 enthält; Hydroxyfunktion in α -Position wird vermutlich von PsyK eingeführt.	67
Abbildung 75: A: Zeitlicher Verlauf der Massenspektren beim Beladen der PsyD-KS3 mit Testsubstrat 37; B: Kinetischer Plot, der die Acylierung von PsyD-KS3 mit den unterschiedlichen Substraten verdeutlicht.	68
Abbildung 76: Kinetischer Plot, der die Acylierung von PsyD-KS3 mit den β -Hydroxythioestern R,S-37 verdeutlicht.....	68
Abbildung 77: Bindungsmodelle für KS1, KS2 und KS3 (von links nach rechts).	69
Abbildung 78: Ausschnitt der Bacillaen-Biosynthese mit KS5 und KS6.	69
Abbildung 79: A: Zeitlich aufgelöste Massenänderung von KS5 aus dem Bacillaen Gencluster mit Testsubstrat 38; B: Kinetischer Plot, der die Acylierung von Bae-KS5 mit den unterschiedlichen Substraten verdeutlicht.	70
Abbildung 80: Bindungsmodell für Bae-KS5.	70
Abbildung 81: Ausschnitt der Psymberin-Biosynthese mit ACP3.....	71

Abbildung 82: Umsetzung des <i>holo</i> -ACP PsyA-ACP3 zum Acyl-ACP am Beispiel des Butyryl-Thioesters 40 ; a: freies ACP, b: ACP mit gebundenem Acyl-Substrat.....	72
Abbildung 83: Massenspektrum der Beladung von PsyA-KS1 mittels PsyA-ACP3. Zu Beobachten ist eine Intensitätsabnahme des Acyl-ACP-Signals und eine Intensitätszunahme des <i>holo</i> -ACP-Signals. Je größer die Konzentration der PsyA-KS1, desto größer die Abnahme des Acyl-ACP.....	72
Abbildung 84: Kinetischer Plot des Acyl-Transfers von Acetyl-ACP auf KS1.	73
Abbildung 85: Umsetzung von Butyryl-ACP und 2-Methyloxazol-4-carbonylthio-ACP mit PedC, von denen nur das Butyryl-ACP toleriert und hydrolysiert wurde.	74
Abbildung 86: Vermutete Methylierung der Hydroxyfunktion von 44a mit PsyD(<i>O</i> -MT).	75
Abbildung 87: Darstellung des Intermediates 44a für den PsyD(<i>O</i> -MT)-Assay im Rahmen der Diplomarbeit.	75
Abbildung 88: Retrosynthese des Thioesters 44b	77
Abbildung 89: Aktivierung des <i>R,R</i> -Co(salen)-Komplexes 71 zu 72	77
Abbildung 90: Mechanismus der Jacobsen-Epoxidierung. ¹²²	78
Abbildung 91: A: HPLC-Messung der Enantiomere <i>S,R</i> - 66 ; B: HPLC-Messung des Enantiomers <i>R</i> - 66	78
Abbildung 92: Eliminierung der Hydroxygruppe aus dem Substrat 61	78
Abbildung 93: Versuch der Methylierung von 67 mittels LiHDMS als Base.	79
Abbildung 94: Methylierung des Substrates 67 mittels 2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-4-methylpyridin und anschließende Entschützung des Isopropylesters 69	79
Abbildung 95: Kupplung des Intermediates 71 mittels EDC zum finalen Thioester 44b	80
Abbildung 96: Vermutete Hydroxylierung des Testsubstrates 45b mit PsyC. In der Psymberinbiosynthese wird die Hydroxygruppe durch ein weiteres Enzym methyliert.	80
Abbildung 97: Retrosynthese der Testsubstrate 45a und 45b ; R: a: -H oder b: -Me.....	81
Abbildung 98: Darstellung des Aldehyds 76 über eine oxidative Spaltung des acetalgeschützten Mannitols 75	82
Abbildung 99: Darstellung der Säure 83b nach Vorschrift von Kiren <i>et al.</i> ⁶⁴	83
Abbildung 100: Versuch der Darstellung des finalen Thioesters 45b durch Kupplung mit Glycin, Entschützung des Ethylesters 85b und anschließender Kupplung mit <i>N</i> -Acetylcysteamin (57)...	83
Abbildung 101: Darstellung des Testsubstrats 45b	84
Abbildung 102: Putative Funktion von PsyC am nicht-methylierten Testsubstrat 45a	85
Abbildung 103: Trennung der Diastereomere nach der PMB-Schützung des Alkohols 80c	85
Abbildung 104: Darstellung der PMB-geschützten Säure 83c	86
Abbildung 105: Darstellung des Thioesters 45c mittels EDC/4-DMAP und versuchte Entschützung zu 45a	87
Abbildung 106: Darstellung der Säure 83d	87

Abbildung 107: Versuchte Kupplung der Säure 83d mit Glycin-Thioester 88	88
Abbildung 108: Puffertest mit PsyD(<i>O</i> -MT); M: Marker, A: MOPS-Puffer, 0.1 M, pH 7.0, B: Tris/HCl-Puffer, 10% Gly, 0.1 M, pH 8.5, C: Kpi-Puffer, 0.1 M, pH 7.0, D: HEPES-Puffer, 0.05 M, pH 7.0, E: HEPES-Puffer, 0.05 M, pH 7.5.	89
Abbildung 109: Puffertest von PsyC; M: Marker, A: HEPES-Puffer, 0.05 M, pH 7.0, B: HEPES-Puffer, 0.05 M, pH 7.5, C: MOPS-Puffer, 0.1 M, pH 7.0, D: Tris/HCl-Puffer, 10% Gly, 0.1 M, pH 8.5, E: Tris/HCl-Puffer, 10% Gly, 0.1 M, pH 7.5, F: Kpi-Puffer, 0.1 M, pH 8.0, G: Kpi-Puffer, 0.1 M, pH 7.0.....	89
Abbildung 110: Putative Funktion von PsyD(<i>O</i> -MT) am Testsubstrat 44a	90
Abbildung 111: Postulierte Methylierung der Hydroxygruppe mit Hilfe von <i>S</i> -Adenosylmethionin (89).	90
Abbildung 112: LC-ESI-microQ-TOF-MS des PsyD(<i>O</i> -MT) Enzymassays mit aufgereinigtem Protein; rot: PsyD-1, Negativkontrolle, 100 μ L Substrat; grün: PsyD-2, 200 μ L Proteinlösung, 100 μ L Substrat; blau: PsyD-3, 600 μ L Proteinlösung, 200 μ L Substrat; Proteinlösung 129 μ g/mL; Substratlösung 200 mM.....	91
Abbildung 113: HPLC-Spektrum des Testubstrats 44a (I) und des Teststandards 44b (II); Laufbedingungen: ACN/H ₂ O 30/70.	92
Abbildung 114: Bildung des Acyl-ACP.....	92
Abbildung 115: Spaltung der Acyl-ACP-Bindung mittels Hydrazin.....	93
Abbildung 116: α -hydroxylierte Polyketide der Pederinfamilie.	94
Abbildung 117: Katalysierte Reaktionen von Fe(II)/ α -Ketoglutaratabhängigen Oxygenasen. A: Das Substrat wird hydroxyliert und α -Ketoglutarat (92) zu Succinat (93) decarboxyliert. B: Aktives Zentrum von Fe(II)/ α -Ketoglutaratabhängigen Oxygenasen: Fe(II) wird von α -Ketoglutarat (92) und einer katalytischen Triade aus Aspartat und zwei Histidinen (94) chelatisiert. ⁷³	95
Abbildung 118: Reaktionsmechanismus von α -Ketoglutaratabhängigen Oxygenasen, Zuerst ligiert das α -Ketoglutarat an das Eisen(II), Sauerstoff lagert sich an, es entsteht ein Eisen(III) Superoxid. Durch Angriff eines Sauerstoffatoms wird das α -Ketoglutarat decarboxyliert, es entsteht ein Eisen(II)-Peroxid. Dieses kann entweder direkt oder über ein hochvalentes Eisen(IV)-Oxointermediat mit dem Substrat reagieren. ¹³⁹	95
Abbildung 119: Im Rahmen der Doktorarbeit von Christoph Kohlhaas synthetisiertes Intermediat 95 zum Test an PsyC.....	96
Abbildung 120: HPLC-Lauf des Thioesters 95 ; Laufbedingungen: ACN/H ₂ O 30/70.....	96
Abbildung 121: Zerfall des Halbaminals 97 zum Amid 98 und Aldehyd 99	96
Abbildung 122: vermutete Umsetzung von 45b mit PsyC.....	97
Abbildung 123: HPLC-Lauf von 45b , Laufbedingungen: ACN/H ₂ O, 30/70.....	97
Abbildung 124: Zerfall des Halbacetals 75b zum Amid 100 und Aldehyd 101	97

Abbildung 125: Umsetzung von PsyC mit Desmethoxypsymberein 102	98
Abbildung 126: Zerfall des Halbaminals 103 zum Aldehyden 104 und Amid 105	98
Abbildung 127: Putative Umwandlung der Testsubstrate 44a und 44b im PsyK-Assay; R= -Me, -H.....	99
Abbildung 128: Oxidation des NADPH (107) während des Assays.	100
Abbildung 129: Reduktion des FAD (109) während des Assays.	100
Abbildung 130: Bildung des Hydroperoxids während des Assays.....	101
Abbildung 131: Erwartetes Produkt bei der Umsetzung von 44a,b mit PsyK; R= -Me, -H.....	101
Abbildung 132: Darzustellende Thioester für den Pederin-PS-Test sowie die Misakinolid-KS- Tests.	102
Abbildung 133: Retrosynthese des Testsubstrats 46 für den Pederin PS-Assay.....	102
Abbildung 134: Retrosynthese des Teststandards 47 für den Pederin PS-Assay.	103
Abbildung 135: Darstellung des Thioesters 46	103
Abbildung 136. Darstellung des Thioesters 47	104
Abbildung 137: Ausschnitt aus der PKS von Pederin, in dem die PS-Domäne lokalisiert ist.....	104
Abbildung 138: Von den PS-Domänen katalysierte Ringbildung in den Strukturen von Psymberein (27), Onnamid A (29) und Pederin (28).....	105
Abbildung 139: HPLC-Messung des Pyransynthesen-Assays von Pederin; A: Referenzspektrum mit Testsubstrat 46 , B: Referenzspektrum mit Standard 47 , C: Probe mit PS-Domäne, D: Probe mit gekochtem Protein.	105
Abbildung 140: HPLC-Messung des Pyransynthesen-Assays von Pederin; A: Referenzspektrum mit Testsubstrat 115 , B: Referenzspektrum mit 3R,7R-116 , C: Probe mit PS-Domäne, D: Probe mit gekochtem Protein.	106
Abbildung 141: Struktur von (3-Ncp)Ala 48	107
Abbildung 142: Putativer Biosyntheseweg von (3-Ncp)Ala (69).....	108
Abbildung 143: Syntheseroute für Testsubstrat 53 über die radikalische Chlorierung von 49 in γ - Position.	108
Abbildung 144: Versuchte Darstellung des Lactons 119 durch radikalische Chlorierung.	109
Abbildung 145: Darstellung des Epoxids 122	109
Abbildung 146: Umsetzung des Imins 123 mit dem Epoxid 122	110
Abbildung 147: Grignard-Ansatz zur Darstellung des Oxims 53	110
Abbildung 148: Schützung des L-Serins (127).	111
Abbildung 149: Darstellung des tosylgeschützten Bromids 131	111
Abbildung 150: Versuchte Oxidation des Alkohols 125 zum Aldehyden 128	111
Abbildung 151: Darstellung der isomeren Lactole 135	112
Abbildung 152: Versuchte Reduktion des Thioesters 139 mit Pd/C.	113
Abbildung 153: Alternativer Reaktionsweg nach Qu <i>et al.</i> zum Aldehyd 134	113

Abbildung 154: Weitere Syntheseroute zum Oxim 70	114
Abbildung 155: A: Struktur von Corallopyronin A (33); B: Bildung des Pyronringschlusses zum Intermediat 56 ; R ₁ : C ₈ H ₁₈ , R ₂ : C ₄ H ₈ NO.	115
Abbildung 156: Testsubstrat 55 für CorB-Assays.....	115
Abbildung 157: Retrosynthese von Testsubstrat 55	116
Abbildung 158: Darstellung des β -Oxo-Thioesters 55 , R = C ₈ H ₁₈	117
Abbildung 159: ¹ H-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 400 MHz) von <i>S</i> -Acetyl- <i>N</i> -acetylcysteamin (36). 205	
Abbildung 160: ¹³ C-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 100 MHz) von <i>S</i> -Acetyl- <i>N</i> -acetylcysteamin (36).	206
Abbildung 161: ¹ H-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 400 MHz) von <i>S</i> -(3-Methyl-3-buten)- <i>N</i> -acetylcysteamin (38).....	206
Abbildung 162: ¹³ C-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 100 MHz) von <i>S</i> -(3-Methyl-3-buten)- <i>N</i> -acetylcysteamin (38).....	207
Abbildung 163: ¹ H-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 400 MHz) von <i>S</i> -Crotonyl- <i>N</i> -acetylcysteamin (39).	207
Abbildung 164: ¹³ C-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 100 MHz) von <i>S</i> -Crotonyl- <i>N</i> -acetylcysteamin (39).	208
Abbildung 165: ¹ H-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 400 MHz) von <i>S</i> - <i>n</i> -Butanoyl- <i>N</i> -acetylcysteamin (40).	208
Abbildung 166: ¹³ C-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 100 MHz) von <i>S</i> - <i>n</i> -Butanoyl- <i>N</i> -acetylcysteamin (40).	209
Abbildung 167: ¹ H-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 400 MHz) von <i>S</i> -(3-Methyl-3-buten)- <i>N</i> -acetylcysteamin (42).....	209
Abbildung 168: ¹³ C-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 100 MHz) von <i>S</i> -(3-Methyl-3-buten)- <i>N</i> -acetylcysteamin (42).....	210
Abbildung 169: ¹ H-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 400 MHz) von (<i>E</i>)-Isopropyl-5-methylhexa-2,4-dienoat (73).....	210
Abbildung 170: ¹³ C-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 100 MHz) von (<i>E</i>)-Isopropyl-5-methylhexa-2,4-dienoat (73).....	211
Abbildung 171: ¹ H-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 400 MHz) von (3 <i>S</i>)-Isopropyl-3-methoxy-5-methylhex-5-ensäureester (69).	211
Abbildung 172: ¹³ C-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 100 MHz) von (3 <i>S</i>)-Isopropyl-3-methoxy-5-methylhex-5-ensäureester (69).	212
Abbildung 173: ¹ H-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 400 MHz) von (3 <i>S</i>)-3-Methoxy-5-methylhex-5-ensäure (70).	212
Abbildung 174: ¹³ C-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 100 MHz) von (3 <i>S</i>)-3-Methoxy-5-methylhex-5-ensäure (70).	213

Abbildung 175: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz) von (3 <i>S</i>)-3-Methoxy-5-methylhex-5-ensäureacetamido-ethylthioester (44b).....	213
Abbildung 176: ^{13}C -NMR Spektrum (CDCl_3 , 100 MHz) von (3 <i>S</i>)-3-Methoxy-5-methylhex-5-ensäureacetamido-ethylthioester (44b).....	214
Abbildung 177: ^1H -NMR Spektrum ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) von Ethyl-2-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-2-hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-enamido)acetat (84b).....	214
Abbildung 178: ^{13}C -NMR Spektrum ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) von Ethyl-2-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-2-hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-enamido)acetat (84b).....	215
Abbildung 179: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz) von 2-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-2-Hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-enamido) essigsäure (85b).....	215
Abbildung 180: ^{13}C -NMR Spektrum (CDCl_3 , 100 MHz) von 2-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-2-Hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-enamido) essigsäure (85b).....	216
Abbildung 181: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz) von <i>S</i> -(2-Acetamidoethyl)-2-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-2-hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-enamido)ethanthioat (45b).....	216
Abbildung 182: ^{13}C -NMR Spektrum (CDCl_3 , 100 MHz) von <i>S</i> -(2-Acetamidoethyl)-2-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-2-hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-enamido)ethanthioat (45b).....	217
Abbildung 183: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz) von (<i>R</i>)-4-((<i>S</i>)-1-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylbut-3-en-1-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (<i>anti</i> - 78c).....	217
Abbildung 184: ^1H -NMR- <i>noe</i> -Spektrum (CDCl_3 , 500 MHz) von (<i>R</i>)-4-((<i>S</i>)-1-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylbut-3-en-1-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (<i>anti</i> - 78c).....	218
Abbildung 185: ^{13}C -NMR Spektrum (CDCl_3 , 100 MHz) von (<i>R</i>)-4-((<i>S</i>)-1-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylbut-3-en-1-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (<i>anti</i> - 78c).....	218
Abbildung 186: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz) von (<i>R</i>)-4-((<i>R</i>)-1-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylbut-3-en-1-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (<i>syn</i> - 78c).....	219
Abbildung 187: ^{13}C -NMR Spektrum (CDCl_3 , 100 MHz) von (<i>R</i>)-4-((<i>R</i>)-1-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylbut-3-en-1-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (<i>syn</i> - 78c).....	219
Abbildung 188: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz) von (<i>R</i>)-4-((<i>S</i>)-1-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylbut-3-en-1,2-diol (79c).....	220
Abbildung 189: ^{13}C -NMR Spektrum (CDCl_3 , 100 MHz) von (<i>R</i>)-4-((<i>S</i>)-1-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylbut-3-en-1,2-diol (79c).....	220
Abbildung 190: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz) von (<i>R</i>)-4-((<i>S</i>)-1-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylbut-3-en-1-yl)-2,2,3,3,8,8,9,9-octamethyl-4,7-dioxa-3,8-disiladecan (80c).....	221
Abbildung 191: ^{13}C -NMR Spektrum (CDCl_3 , 100 MHz) von (<i>R</i>)-4-((<i>S</i>)-1-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylbut-3-en-1-yl)-2,2,3,3,8,8,9,9-octamethyl-4,7-dioxa-3,8-disiladecan (80c).....	221
Abbildung 192: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz) von (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-2-(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyloxy)-3-(4-methoxybenzyl-oxy)-5-methylhex-5-en-1-ol (81c).....	222

Abbildung 193:	¹³ C-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 100 MHz) von (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-2-(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyloxy)-3-(4-methoxybenzyl-oxy)-5-methylhex-5-en-1-ol (81c).	222
Abbildung 194:	¹ H-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 400 MHz) von (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-2-(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyloxy)-3-(4-methoxybenzyl-oxy)-5-methylhex-5-enal (82c).	223
Abbildung 195:	¹³ C-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 100 MHz) von (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-2-(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyloxy)-3-(4-methoxybenzyl-oxy)-5-methylhex-5-enal (82c).	223
Abbildung 196:	¹ H-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 400 MHz) von (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-2-(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyloxy)-3-(4-methoxybenzyl-oxy)-5-ensäure (83c).	224
Abbildung 197:	¹³ C-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 100 MHz) von (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-2-(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyloxy)-3-(4-methoxybenzyl-oxy)-5-ensäure (83c).	224
Abbildung 198:	¹ H-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 400 MHz) von <i>S</i> -(2-Acetamidoethyl)-2-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-2-hydroxy-3-(4-methoxybenzyloxy)-5-methylhex-5-enamido)ethanthioat (45c).	225
Abbildung 199:	¹³ C-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 100 MHz) von <i>S</i> -(2-Acetamidoethyl)-2-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-2-hydroxy-3-(4-methoxybenzyloxy)-5-methylhex-5-enamido)ethanthioat (45c).	225
Abbildung 200:	¹ H-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 400 MHz) von (2 <i>R</i>)-5-Methylhex-5-en-1,2,3-triol (79d).	226
Abbildung 201:	¹³ C-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 100 MHz) von (2 <i>R</i>)-5-Methylhex-5-en-1,2,3-triol (79d).	226
Abbildung 202:	¹ H-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 400 MHz) von (2 <i>R</i>)-1,2,3-Tri-(<i>tert</i> -butyldimethylsilyloxy)-5-methylhex-5-en (80d).	227
Abbildung 203:	¹³ C-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 100 MHz) von (2 <i>R</i>)-1,2,3-Tri-(<i>tert</i> -butyldimethylsilyloxy)-5-methylhex-5-en (80d).	227
Abbildung 204:	¹ H-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 400 MHz) von (2 <i>R</i>)-2,3-Di-(<i>tert</i> -butyldimethylsilyloxy)-3-5-methylhex-5-en-1-ol (81d).	228
Abbildung 205:	¹³ C-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 100 MHz) von (2 <i>R</i>)-2,3-Di-(<i>tert</i> -butyldimethylsilyloxy)-3-5-methylhex-5-en-1-ol (81d).	228
Abbildung 206:	¹ H-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 400 MHz) von (2 <i>S</i>)-2,3-Bis-(<i>tert</i> -butyldimethylsilyloxy)-5-methylhex-5-enal (82d).	229
Abbildung 207:	¹³ C-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 100 MHz) von (2 <i>S</i>)-2,3-Bis-(<i>tert</i> -butyldimethylsilyloxy)-5-methylhex-5-enal (82d).	229
Abbildung 208:	¹ H-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 400 MHz) von (2 <i>S</i>)-2,3-Bis-(<i>tert</i> -butyldimethylsilyloxy)-5-methylhex-5-enolsäure (83d).	230
Abbildung 209:	¹³ C-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 100 MHz) von (2 <i>S</i>)-2,3-Bis-(<i>tert</i> -butyldimethylsilyloxy)-5-methylhex-5-enolsäure (83d).	230
Abbildung 210:	¹ H-NMR Spektrum (CDCl ₃ , 400 MHz) von <i>E-S</i> -(2-Acetamidoethyl)-7-hydroxyhept-2-enthioat (46).	228

Abbildung 211: ^{13}C -NMR Spektrum (CDCl_3 , 100 MHz) von <i>E</i> - <i>S</i> -(2-Acetamidoethyl)-7-hydroxyhept-2-enthioat (46).	231
Abbildung 212: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz) von <i>S</i> -(2-Acetamidoethyl)-2-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)ethanthioat (47).	227
Abbildung 213: ^{13}C -NMR Spektrum (CDCl_3 , 100 MHz) von <i>S</i> -(2-Acetamidoethyl)-2-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)ethanthioat (47).	232
Abbildung 214: ^1H - <i>noe</i> -NMR Spektrum (D_2O , 500 MHz) von 3-Amino-5-(2-hydroxyethyl)dihydrofuran-2(3H)-on (132).	233
Abbildung 215: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz) von 2-(2-Nonyl-1,3-dioxolan-2-yl)essigsäure (148).	233
Abbildung 216: ^{13}C -NMR Spektrum (CDCl_3 , 100 MHz) von 2-(2-Nonyl-1,3-dioxolan-2-yl)essigsäure (148).	234
Abbildung 217: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz) von <i>S</i> -(2-Acetamidoethyl)-2-(2-nonyl-1,3-dioxolan-2-yl)ethanthioat (55).	234
Abbildung 218: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 100 MHz) von <i>S</i> -(2-Acetamidoethyl)-2-(2-nonyl-1,3-dioxolan-2-yl)ethanthioat (55).	235
Abbildung 219: Vektorkarte des Vektors pBlueskript II SK(+).	236
Abbildung 220: Plasmidkarte und MCS für den pBlueskript II SK(+/-) Vektor.	236
Abbildung 221: Vektorkarte des pHis8 Vektors; MCS:multiple cloning site des Vektors.....	236
Abbildung 222: Multiple cloning site des pHis8 Vektors.....	237
Abbildung 223: Vektorkarte der Konstrukte pSF10 und pSF11; MCS: multiple cloning site. ...	237
Abbildung 224: Vektorkarte der Konstrukte pSF3 und pSF7; MCS: multiple cloning site.	237
Abbildung 225: Vektorkarte der Konstrukte pSF4 und pSF8/9; MCS: multiple cloning site.	238

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausbeuten der Thioester 36-40 und 43 , die über die Kupplungsreaktion mit EDC erhalten wurden.	52
Tabelle 2: Verwendete Aminosäuren zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit der KS1-Enzyme	61
Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme.....	175
Tabelle 4: Verwendete Primer, Schnittstellen sind unterstrichen abgebildet.....	175
Tabelle 5: Verwendete Vektoren.....	176
Tabelle 6: Dargestellte Konstrukte.....	176
Tabelle 7: PCR-Reaktionsbedingungen	178
Tabelle 8: PCR-Bedingungen für die <i>Phusion</i> [®] -High-Fidelity-Polymerase	179
Tabelle 9: Verwendete Puffer für die Puffertests	186

Abkürzungen

Chemische Verbindungen sind im Text mit fett gedruckten Ziffern gekennzeichnet. Literaturhinweise wurden mit hochgestellten arabischen Ziffern kenntlich gemacht. Dieser Arbeit sind eine Zusammenfassung und ein Abstract in englischer Sprache vorangestellt, in der die Nummerierung von der im Hauptteil verwendeten Nummerierung abweicht. Deshalb wurden in diesen Abschnitten die Strukturen mit römischen Ziffern gekennzeichnet. Das Literaturverzeichnis befindet sich am Ende der vorliegenden Arbeit und beinhaltet alle Literaturstellen.

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

AcOH:	Essigsäure
A-Domäne:	Adenylierungsdomäne
AMP:	Adenosinmonophosphat
AT:	Acyltransferase
ATP:	Adenosintriphosphat
Bn:	Benzyl
Boc:	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc ₂ O:	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
bp:	Basenpaar
br:	broad (breit)
bzw.:	beziehungsweise
<i>c</i> :	Konzentration
CDI:	Carbonyldiimidazol
C-Domäne:	Kondensationsdomäne
CoA:	Coenzym A
d:	Dublett
DCC:	<i>N</i> - <i>N</i> '-Dicyclohexylcarbodiimid
DMF:	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO:	Dimethylsulfoxid
dsDNA:	doppelsträngige DNA
EDC-HCl:	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid
eq.:	Äquivalente
ER:	Enoylreduktase

ESI:	Elektronensprayionisierung
Et ₂ O:	Diethylether
Et ₃ N:	Triethylamin
EtOAc:	Essigsäureethylester
EtOH:	Ethanol
FAS:	Fettsäuren-Biosynthese
GNAT:	GCN5-verwandte <i>N</i> -Acetyltransferase
h:	Stunde
HBTU:	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HOBt:	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC:	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
KR:	Ketoreduktase
KS:	Ketosynthase
LC:	Flüssigkeitschromatographie
LM:	Lösungsmittel
M:	Molar
m:	Multiplet
<i>m</i> CPBA:	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
MeOH:	Methanol
MeOTf:	Methyltrifluormethansulfonat
min:	Minuten
MS:	Massenspektrometrie
MT:	Methyltransferase
NMM:	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMR:	Kernresonanzspektroskopie
NRPS:	Nicht-ribosomale Peptidsynthase
ORF:	Offener Leserahmen
PDC:	Pyridiniumdichromat
PKS:	Polyketidsynthase
PMB:	<i>para</i> -Methoxybenzyl
PMBCl:	<i>para</i> -Methoxybenzylchlorid
PPant:	4' Phosphopanthetintransferase
ppm:	parts per million
PPTase:	Phosphopantetheinyltransferase
q:	Quartett

ABKÜRZUNGEN

r.t.:	Raumtemperatur
R:	Reduktase
R _f :	Retentionsfaktor
s:	Singulett
SAM:	<i>S</i> -Adenosylmethionin
SNAC:	<i>N</i> -Acetylcysteamin
t:	Triplett
TBSCl:	<i>tert</i> -Butyldimethylchlorsilan
TE:	Thioesterase
TFA:	Trifluoressigsäure
THF:	Tetrahydrofuran
Ts-Cl:	<i>p</i> -Toluolsulfonsäurechlorid
ü/N:	über Nacht
ÜZ	Übergangszustand
vgl.:	vergleiche
z.B.:	zum Beispiel

Zusammenfassung

Polyketide werden in vielen Bereichen der Medizin eingesetzt. Sie sind Naturstoffe und werden in Organismen von Polyketidsynthasen (PKS) gebildet. Der Mechanismus der Kettenverlängerung bei der Polyketidbildung ist eine Claisen-artige Kondensation von Acylbausteinen, durch die diese in die wachsende Polyketidkette eingebaut werden. Katalysiert wird diese Reaktion von Ketosynthasedomänen (KS), wobei die Bausteine von Acyltransferasen (AT) selektiert werden. Durch Studium der Biosynthese von Erythromycin A (I) wurde das so genannte Kolinearitätsprinzip entdeckt. Dieses beschreibt eine enge Korrelation zwischen der Enzymarchitektur und der Struktur des Polyketids. In den letzten Jahren wurde jedoch die neue Gruppe der *trans*-AT-PKS entdeckt, bei denen das Kolinearitätsprinzip oft nicht zutrifft. Bei dieser Art der PKS sind die AT- anders im Gegensatz zu herkömmlichen PKS nicht in Multidomänenenzyme integriert sondern agieren in *trans* zu selbigen. Polyketide, die von *trans*-AT-PKS gebildet werden, sind unter anderem Psymberin (II), Bacillaen (III) und Pederin (IV) (Abbildung I).

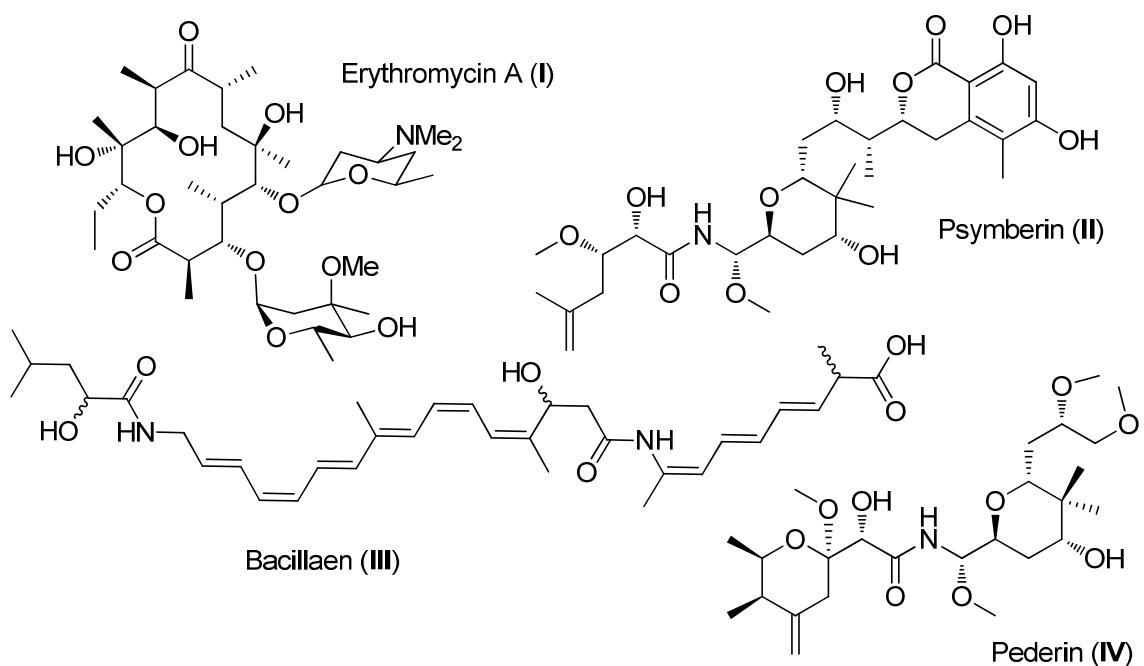


Abbildung I: Strukturen von Erythromycin A (I), Psymberin (II), Bacillaen (III) und Pederin (IV).

Eine phylogenetische Analyse von Piel *et al.* zeigte, dass die Gensequenzen der KS in *trans*-AT-PKS mit den Teilstrukturen der jeweiligen Substrate korrelieren. Auf dieser Basis ist es möglich, aufgrund der Gensequenzen von KS die Struktur eines Polyketids vorherzusagen. Da die Korrelation von Substratstruktur und KS-Sequenz nur auf *in silico*-Daten beruhte, sollte in der vorliegenden Arbeit die Substratspezifität mittels *in vitro*-Experimenten untersucht werden.

Hierzu wurden die ersten drei Psymberin-KS-Domänen (KS1, KS2, KS3) in *E. coli* überproduziert und Testsubstrate synthetisiert (Abbildung II). Die fünfte KS (KS5) aus dem Bacillaen-Gencluster wurde von Annette Kampa überproduziert und ebenfalls untersucht.

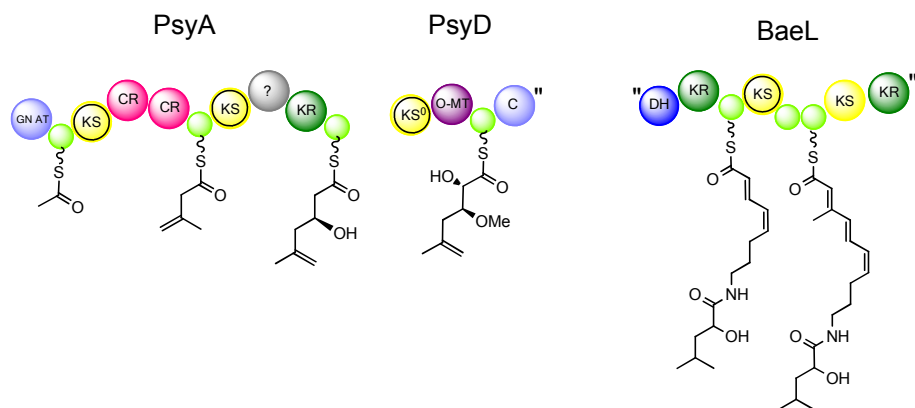


Abbildung II: Im Rahmen dieser Arbeit überproduzierte KS-Domänen (schwarz umkreist in gelb) aus dem Psymberin- und Bacillaen-Gencluster.

Die *in vitro*-Assays wurden von Matthew Jenner aus dem Arbeitskreis Oldham an der Universität Nottingham (UK) durchgeführt. Hierbei wurden die KS-Domänen mit den Substraten inkubiert und massenspektrometrisch untersucht. Anhand der phylogenetischen Untersuchung wurde vorhergesagt, dass die Substratspezifität nur bis zur β -Position nach der Thioesterbindung relevant ist. Aus diesem Grund wurden die kurzkettigen Testsubstrate **V-XII** synthetisiert, die in α , β -Position unterschiedliche funktionelle Gruppen besitzen (Abbildung III). Die Thioester **VIa** sowie **VIb** wurden im Rahmen einer anderen Arbeit synthetisiert und ebenfalls mit den Ketosynthasedomänen umgesetzt.

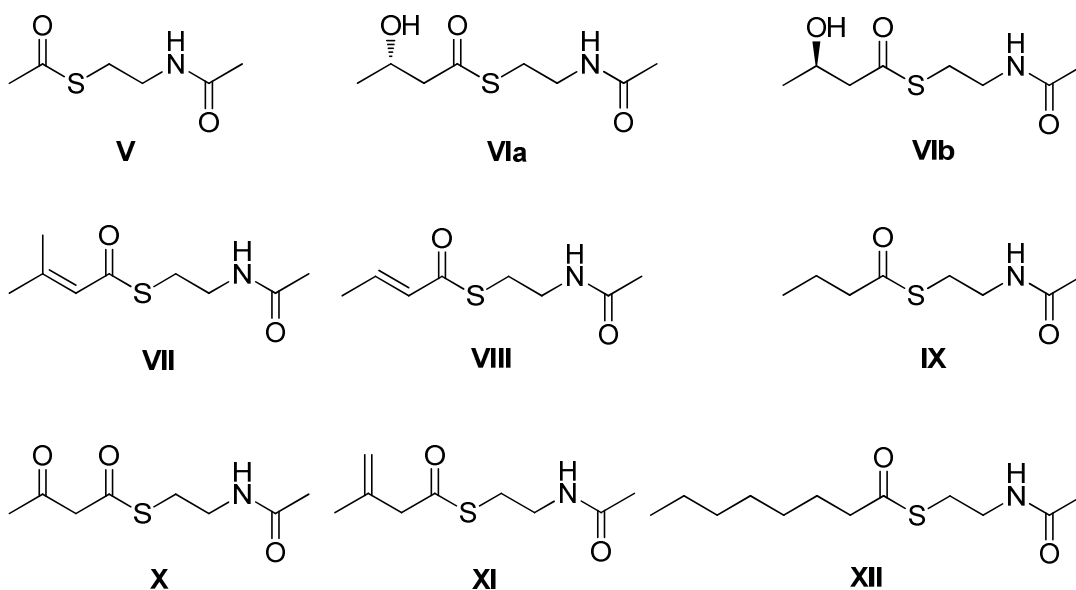


Abbildung III: Für die KS-Assays synthetisierte Testsubstrate V–XII.

Die KS1 sowie KS2 aus dem Psymberin-Gencluster erwiesen sich als relativ unselektiv bei Umsetzungen mit den SNAC-Derivaten **IV–XII**. Die kohlenstoffverzweigten Intermediate **VII** und **XI** waren jedoch nicht in der Lage, KS3 sowie KS5 aus dem Bacillaen-Gencluster zu acylieren. Hier zeigte sich eine deutliche Bevorzugung der unverzweigten Testsubstrate. Die vorhergesagte Substratspezifität von KS in *trans*-AT-Systemen wurde zum ersten Mal durch *in vitro*-Daten gestützt. Es wurde gezeigt, dass die Spezifität bis zur β -Position stark ausgeprägt und für die einzelnen KS unterschiedlich ist. Diese Erkenntnis ist sowohl für die Analyse weiterer *trans*-AT-Gencluster als auch für die kombinatorische Biosynthese von Nutzen.

In einem zweiten Projekt wurden die Testsubstrate **XIIIb** und **XIVb** zur *in vitro*-Untersuchung der Proteine PsyD, PsyC sowie PsyK aus dem Psymberin-Gencluster synthetisiert und in Proteinassays getestet (Abbildung IV). Hierdurch sollte die Funktion der Enzyme untersucht werden. **XIIIa** wurde bereits im Rahmen einer anderen Arbeit synthetisiert.

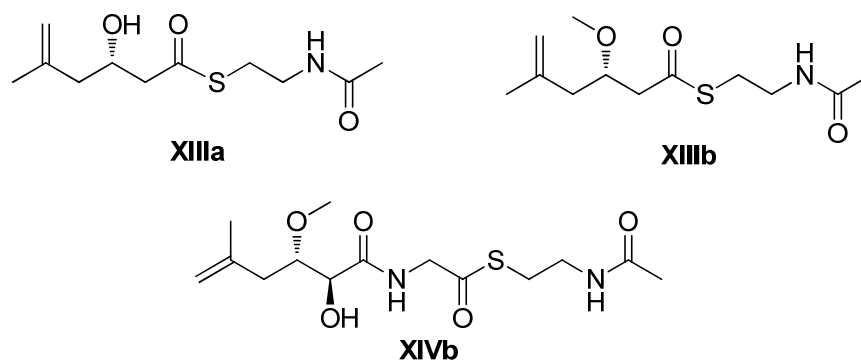


Abbildung IV: Für die Proteinassays für PsyC, PsyD sowie PsyK synthetisierte Substrate XIIIa,b und XIVa,b.

Im ersten Modul von PsyD ist eine putative *O*-Methyltransferasedomäne (*O*-MT) integriert. Anhand der Position dieser Domäne im Gencluster kann vermutet werden, dass diese an der Biosynthese der Methoxygruppe an der Amid-Seitenkette beteiligt ist. Eine weitere Besonderheit stellen die α -Hydroxylasen PsyC und PsyK dar (Abbildung V).

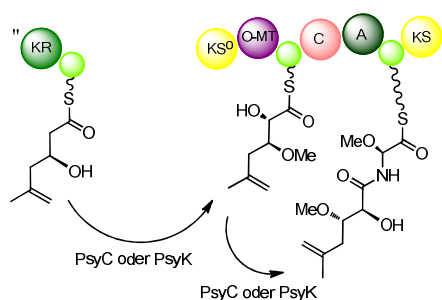


Abbildung V: Ausschnitt aus der Biosynthese von Psymberin (II): PsyC/PsyK: putative α -Hydroxylasen, (*O*-MT): putative *O*-Methyltransferase.

Mittels Enzymassays mit den synthetisierten Molekülen **XIIIa,b** und **XIVb** sowie dem von Max Bielitz aus dem Arbeitskreis um Prof. Jörg Pietruszka synthetisierten Desmethoxypsymberein sollte die Funktion der Enzyme geklärt werden. Die Assays mit den synthetisierten Testsubstraten zeigten jedoch trotz Variation der Bedingungen keine Umsetzung.

In einem weiteren Teilprojekt der vorliegenden Arbeit wurden Testsubstrate zur näheren Untersuchung der Pederin (**IV**) *trans*-AT-PKS synthetisiert. Im Pederin-Gencluster befindet sich eine Pyransynthasedomäne (PS), die putativ für einen Ringschluss innerhalb der wachsenden Kette während des Biosyntheseweges verantwortlich ist (Abbildung VI).

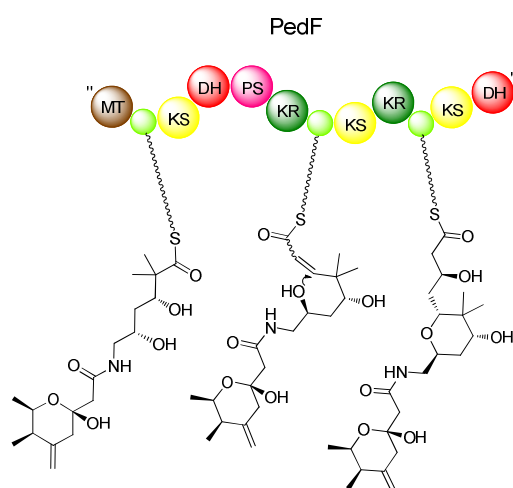


Abbildung VI: Ausschnitt aus der Biosynthese von Pederin (**IV**) in dem sich die heterolog exprimierte PS-Domäne (pink) befindet.

Um dies zu testen, wurden von Petra Pöplau aus dem Arbeitskreis Piel mit dem synthetisierten Testsubstrat **XV** und dem Teststandard **XVI** PS-Assays durchgeführt (Abbildung VII) und diese per HPLC vermessen. Es wurde hierbei gezeigt, dass diese Domäne des Pederin-Genclusters tatsächlich für den Ringschluss verantwortlich ist. Sie katalysiert eine intramolekulare Oxakonjugat-Addition der Hydroxyfunktion an die Doppelbindung innerhalb des Substrats.

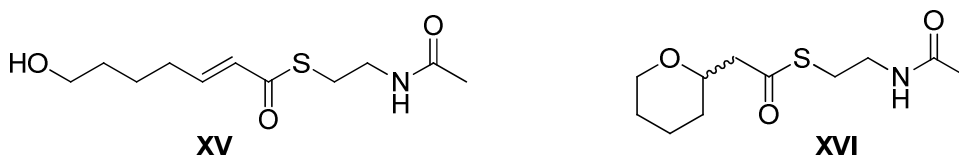


Abbildung VII: Testsubstrat **XV** und Teststandard **XVI** für den PS-Assay von Pederin.

Für ein weiteres Projekt, eine Co-Kristallisierung und Durchführung von Assays mit CorB, wurde Intermediat **XVII** dargestellt (Abbildung VIII). CorB ist eine Domäne aus dem Corallopyronin-

Biosyntheseweg und ist putativ für eine Verbindung zweier Kettenbausteine durch Bildung eines Pyronrings verantwortlich.

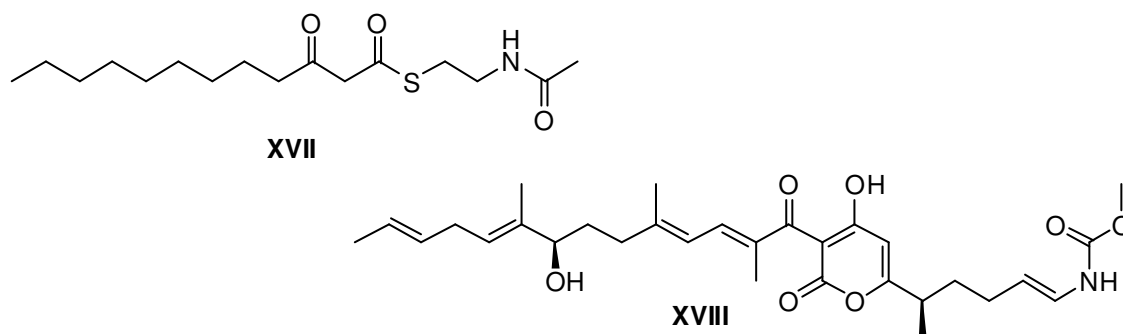


Abbildung VIII: Testsubstrat XVII für eine Co-Kristallisierung und Durchführung der Assays mit CorB; Struktur von Corallopyronin (XVIII).

Die Art der Biosynthese von Corallopyronin (**XVIII**) ist außergewöhnlich, so werden in zwei unabhängigen Biosynthesewegen zwei Ketten synthetisiert, die dann anschließend über einen Pyronring verbunden werden. Um Näheres über diesen Biosyntheseweg zu erfahren, wurden im Arbeitskreis König von Dr. Till Schäberle Punktmutanten erzeugt, die anschließend mit dem Thioester **XVII** co-kristallisiert werden und in Aktivitätstests umgesetzt werden sollen. Weitere Ergebnisse stehen noch aus.

Abstract

Polyketides are complex natural products that are the basis of many of today's drugs. They are produced by so-called polyketide synthases (PKS) in organisms. The mechanism of polyketide elongation is a Claisen-like condensation of acyl building blocks, which is catalyzed by ketosynthase domains (KS). Building blocks are provided by acyltransferase (AT) domains. On the basis of the biosynthesis of erythromycin A (**I**), the so-called "textbook-PKS" colinearity principle was postulated. It postulates a correlation between the architecture of the enzyme and the structure of the polyketide. Within the last years, a new group of *trans*-AT-polyketide synthases was discovered to which the colinearity principle does not apply. This type of polyketide synthases does not contain acyltransferase-domains (ATs) located as domains within the large multimodular PKS proteins. In contrast, they are stand-alone proteins that act *in trans*. Examples of polyketides that are generated by *trans*-AT-PKS are psymberin (**II**), bacillaene (**III**) and pederin (**IV**) (Figure I).

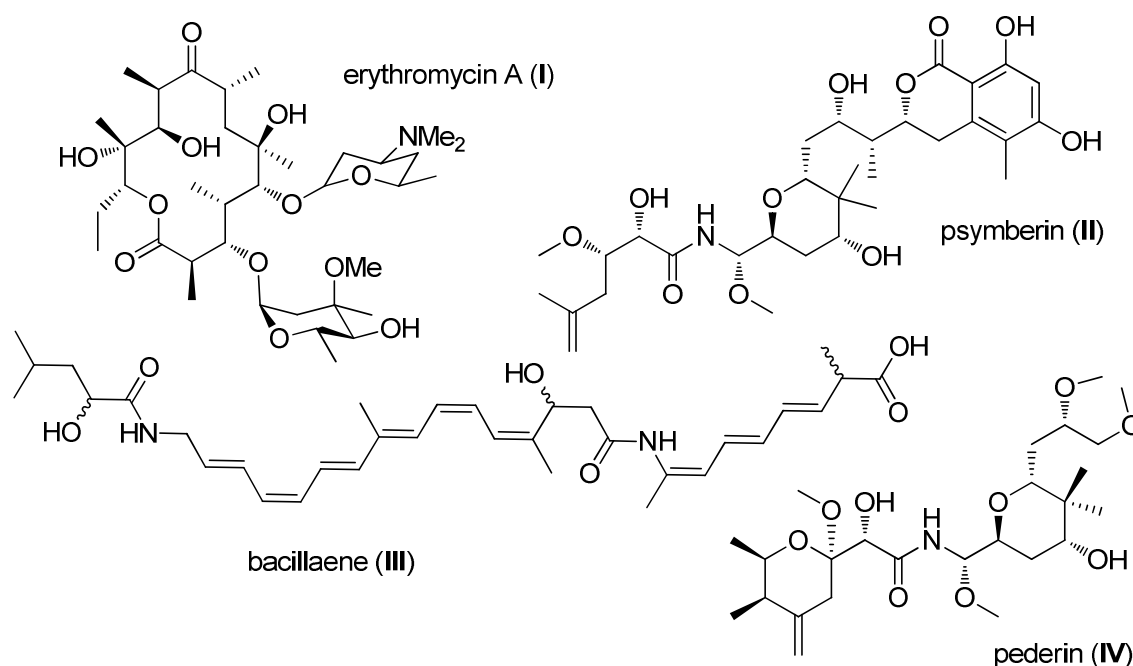


Figure I: Structures of erythromycin A (**I**), psymberin (**II**), bacillaene (**III**) and pederin (**IV**).

A phylogenetic analysis from Piel *et al.* showed a correlation between the amino acid sequences of the KS and parts of the structures of the respective substrate. Consequently it should be possible to predict the structure of the polyketide from the gene sequence of KS. Since this principle thus far relies largely on *in silico* data, PKS domain substrate specificity was investigated and in this work through *in vitro* experiments. The first three KS domains of the

psymberin gene cluster (KS1, KS2, KS3) were heterologously expressed in *E. coli* and suitable test substrates were synthesized. The fifth KS (KS5) of the bacillaene gene cluster was also expressed by Annette Kampa (Figure II).

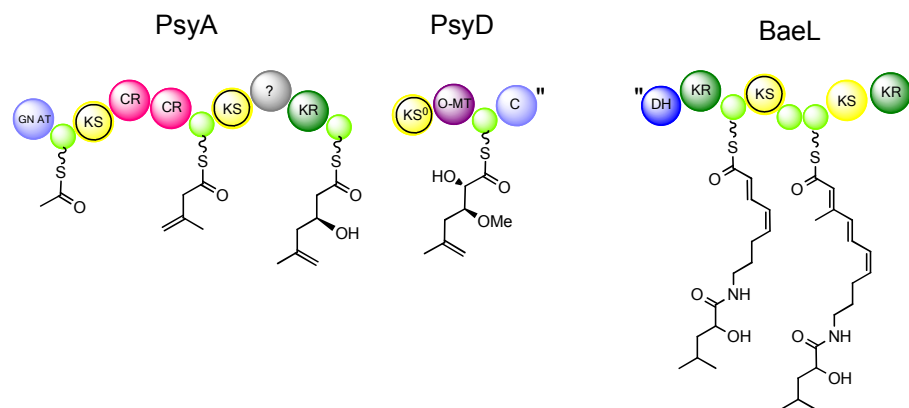


Figure II: Heterologously expressed KS domains (marked in yellow) of the psymberin and bacillaene gene cluster.

Analysis of the assays was performed by Matthew Jenner in the group of Prof. Oldham in Nottingham (UK). He incubated the KS domains with the testsubstrates and analysed the products by mass spectrometry.

On the basis of the phylogenetic analyses, substrate specificity was predicted to be relevant only until the β -position of the thioesterbond. Short testsubstrates **V-XII** that differ in the α,β -position were therefore synthesized (Figure III). The thioesters **VIa** and **VIb** were synthesized by Dr. Christoph Kohlhaas and were also used in the KS assays.

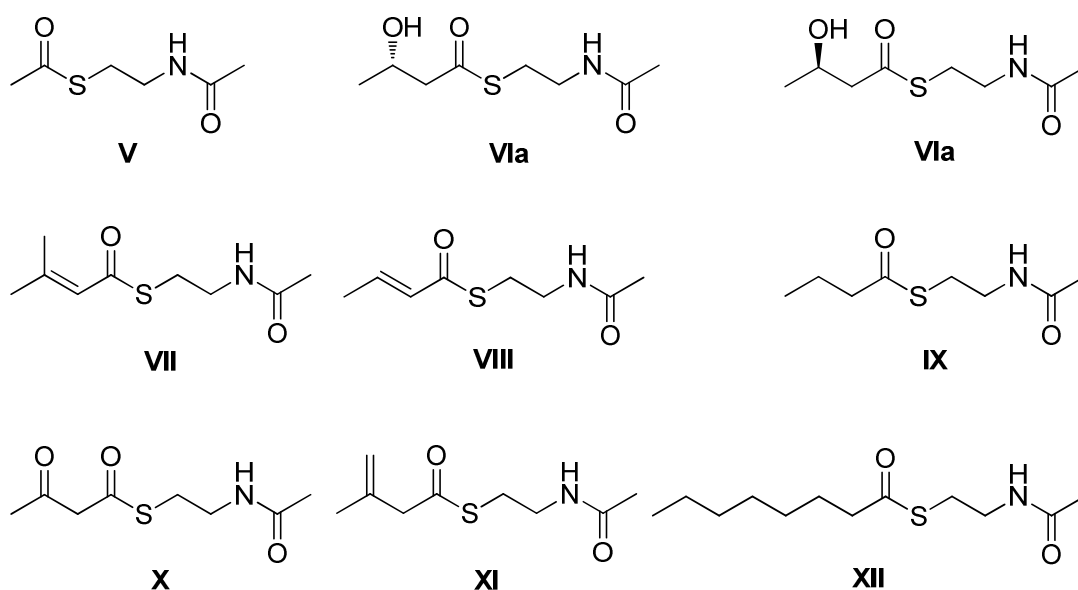


Figure III: Testsubstrates V–XII synthesized for KS assays.

Incubations of the SNAC derivatives **V-XII** with KS1 and KS2 of the psymberin gene cluster revealed that these KSs were not specific, as they accepted unbranched as well as branched substrates. The carbon-branched intermediates **VII** and **XI** were not able to acylate KS3 and KS5 of the bacillaene gene cluster, thus showing a preference for the unbranched testsubstrates. The specificities of KSs in *trans*-AT-systems were experimentally tested for the first time *in vitro* in these studies. It was shown that substrate specificity is observed for some KSs up until the β -position. This knowledge is of use for the analysis of further *trans*-AT gene clusters as well as for combinatorial biosynthesis.

In the second project, the test substrates **XIIIb** and **XIVb** were synthesized for *in vitro*-analysis of proteins PsyD, PsyC and PsyK from the psymberin gene (Figure IV). **XIIIa** was synthesized in earlier work.

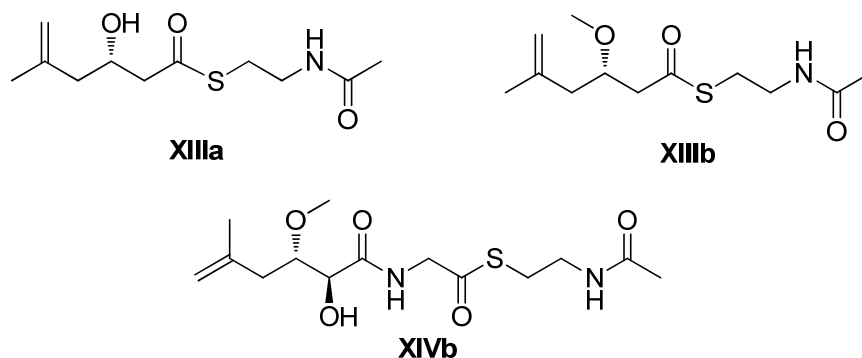


Figure IV: Synthesized test substrates for assays with PsyC, PsyD and PsyK.

A putative *O*-methyltransferase (*O*-MT) domain is encoded in the first module of PsyD. On the basis of its position in the gene cluster, it can be predicted that this domain is involved in the biosynthesis of the methoxy functionality at the amide side chain. Further unusual components are the predicted α -hydroxylases PsyC and PsyK (Figure V).

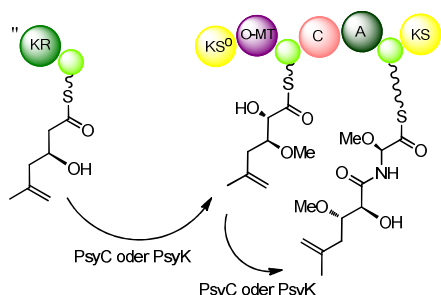


Figure V: Model for psymberin (II) biosynthesis: PsyC/PsyK: putative α -hydroxylases, *O*-MT: putative *O*-methyltransferase.

The function of the enzymes were to be tested in enzymatic assays with the synthesized molecules **XIIIa,b** and **XIVb** as well as with desmethoxypsymbirin synthesized by Dr. Max Bielitz. During this work, the testsubstrates **XIIIb** and **XIVb** were synthesized and tested in protein assays. No conversion was observed in any of the tested assay conditions.

Another project was to synthesize a test substrate and a product standard for a closer examination of the pederin *trans*-AT PKS. The pederin gene cluster encodes a suspected pyran synthase domain (PS) for ring closure of the growing chain during biosynthesis (Figure VI).

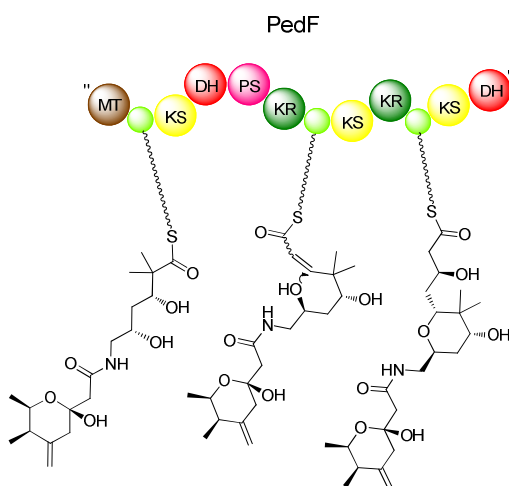


Figure V:Part of the pederin (IV) biosynthesis: Proposed function of the PS-domain (isolated PS-domain is coloured in pink).

To test these putative PS-domains, Petra Pöplau conducted PS-assays with the synthesized substrate **XV** and standard **XVI** (Figure VI). She incubated the substrate **XV** with the heterologously expressed PS-domain and analysed the results by HPLC with the standard **XVI**.

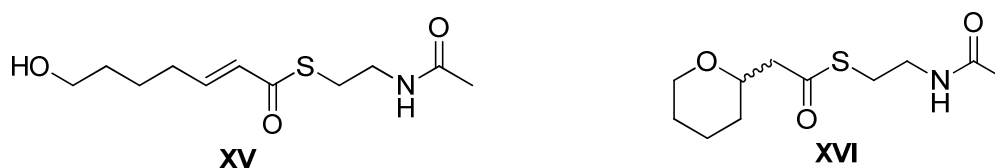


Figure VI: Test substrates for the PS-assay.

The results of these experiments revealed that the proposed PS-domain from the pederin gene cluster was in fact responsible for ring closure via an intramolecular oxa conjugate-addition.

Another interesting ring-closure can be found in the biosynthesis of coralopyronin. CorB is a putative domain thought to be responsible for connection of two chains through a pyrone ring in

corallopyronin biosynthesis. The proposed intermediate **XVII** was synthesized for a co-crystallization and for assays with this domain (Figure VII).

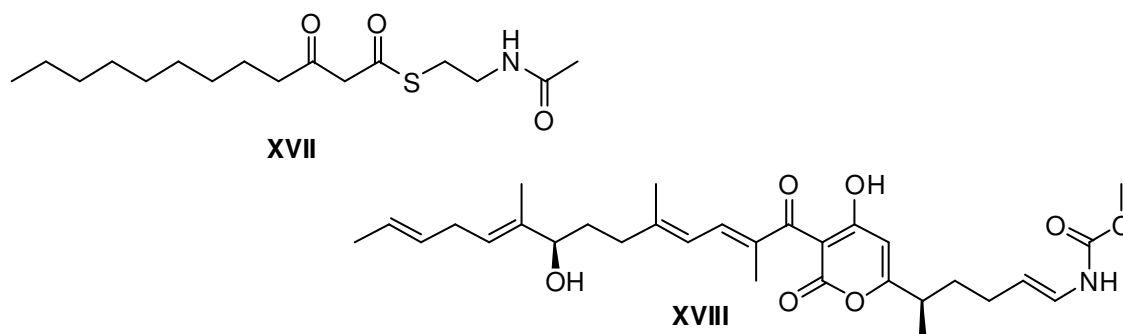


Figure VIII: Testsubstrate **XVII** for co-crystallization with CorB; Structure of Corallopyronin (**XVIII**).

The biosynthesis of corallopyronin (**XVIII**) is unique in that two chains are synthesized separately and connected at the end of the biosynthesis. It is suggested that CorB is a *trans*-acting ketosynthase and is proposed to catalyze the Claisen condensation responsible for the connection of the two chains. To find out more about this biosynthetic step, mutants of CorB were created by Dr. Till Schäberle from the group of Prof. König. The mutants will be co-crystallized with testsubstrate **XVII** and tested in activity tests. So far, the results look promising - and further tests are in progress.

1. Einleitung

1.1 Polyketide

Polyketide sind Naturstoffe, die sehr vielfältige Strukturen ausbilden. Sie können als Polyphenole, Makrolide, Polyene, Endiine oder Polyether vorliegen. In ihrem natürlichen Kontext wird ihre Wirkungsweise als Pigment, Virulenzfaktor, Boten- oder Abwehrstoff vermutet.¹ Diese strukturelle Diversität resultiert aber oft auch in biologischer Aktivität, die von Nutzen für die Medizin ist. So wirken Polyketide unter anderem antibiotisch- wie Erythromycin A (1) oder Actinorhodin (2), anticancerogen- wie Epothilon C (3), cholesterinsenkend- wie Lovastatin (4) oder immunsuppressiv wie Rapamycin (5) (Abbildung 1).

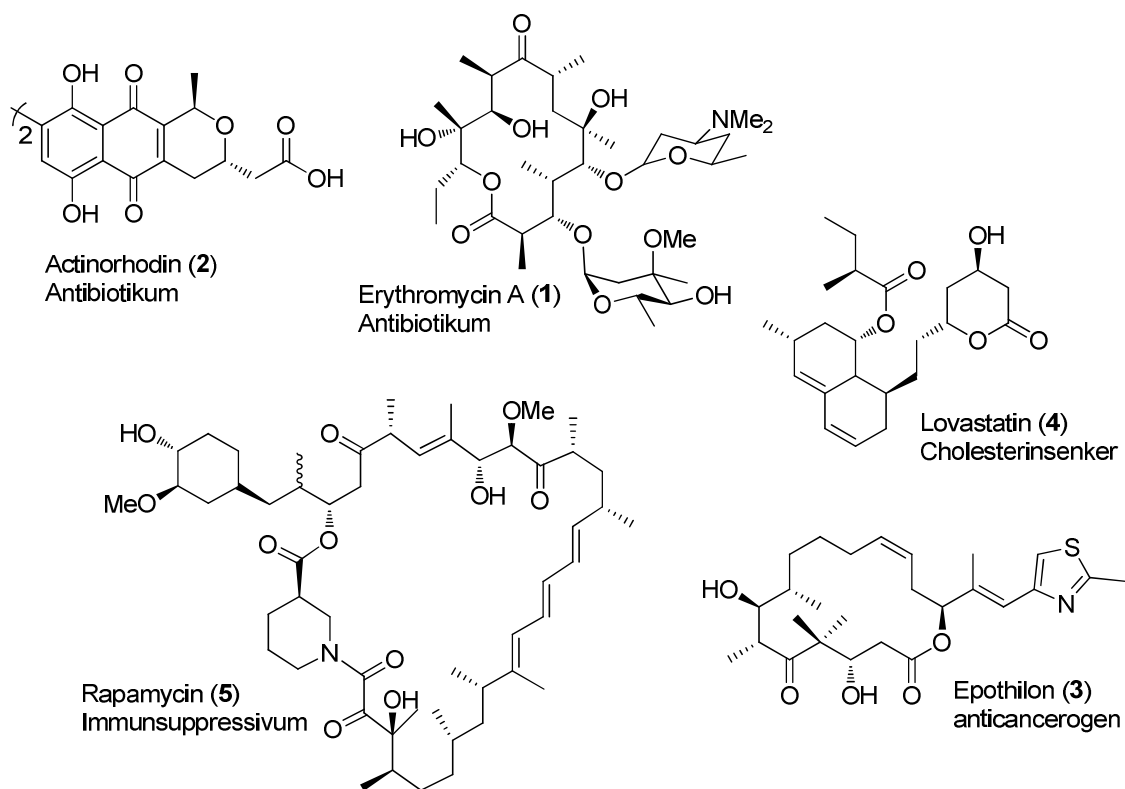


Abbildung 1: Strukturen von Polyketiden; Erythromycin A (1), Actinorhodin (2), Epothilon C (3), Lovastatin (4) und Rapamycin (5).

Demnach besteht ein reges Interesse daran, neue Wirkstoffe in Form von Polyketiden zu finden oder Analoga zu synthetisieren. Ein wichtiges Beispiel hierfür ist die Darstellung von 7-*O*-Methylerythromycin (Clarithromycin),² das durch Partialsynthese aus

Erythromycin A (**1**) erhalten wurde und etwa doppelt so wirksam wie dieses ist. Ein neueres Gebiet ist die Darstellung von Analoga mit Hilfe der kombinatorischen Biosynthese.³ Hierbei werden Teile aus verschiedenen Polyketidsynthase-Genclustern miteinander kombiniert und so direkt aus dem künstlichen Gencluster neue Substanzen gewonnen, die sich in der Kettenlänge, Regiospezifität und Oxidationsstufe an verschiedenen Positionen im neuen Molekül von dem ursprünglich produzierten unterscheiden. So gelang es der Gruppe um Khosla *et al.* 1993 erstmals, drei von Actinomycin (**2**) verschiedene Strukturen aus dem modifizierten Actinomycin-Gencluster zu erhalten.⁴ Viele Polyketide werden von Mikroorganismen in Schwämmen produziert.⁵

1.1.1 Biosynthese von Polyketiden

Polyketidsynthasen (PKS) sind große Enzymkomplexe, die für die Produktion von Polyketiden verantwortlich sind. Diese Enzymkomplexe können eine Größe von 100-10.000 kDa haben. Somit gehören manche Vertreter zu den größten bekannten Proteinen.⁶ Die Biosynthese von Polyketiden hat eine große Ähnlichkeit mit der Fettsäurebiosynthese durch Fettsäuresynthasen (engl: Fatty Acid Synthase, FAS). Beide Synthasen generieren strukturell anspruchsvolle Substrate aus einfachen Vorstufen über Biosynthesewege, die auch Gemeinsamkeiten in der Art der agierenden Enzyme aufweisen. Ein Unterschied besteht in der höheren katalytischen Flexibilität der PKS. Während die Fettsäurebiosynthese im Wesentlichen aus den vorgegebenen Schritten Ketoreduktion, Dehydratisierung und Enoylreduktion besteht, kann der Grad der Reduktion bei den PKS variieren.

1.1.2 Bindungsknüpfung in Polyketidsynthasen

Zuerst wird ein Coenzym A-Ester **10** gebildet. Dazu greift die Acyl-Startereinheit **6** nukleophil am Adenosintriphosphat (**7**) an; hierdurch entsteht der aktivierte Ester **9**. Dieser Ester wird von Coenzym A (**8**) angegriffen und es entsteht als aktiviertes Intermediat der CoA-Ester **10** (Abbildung 2).

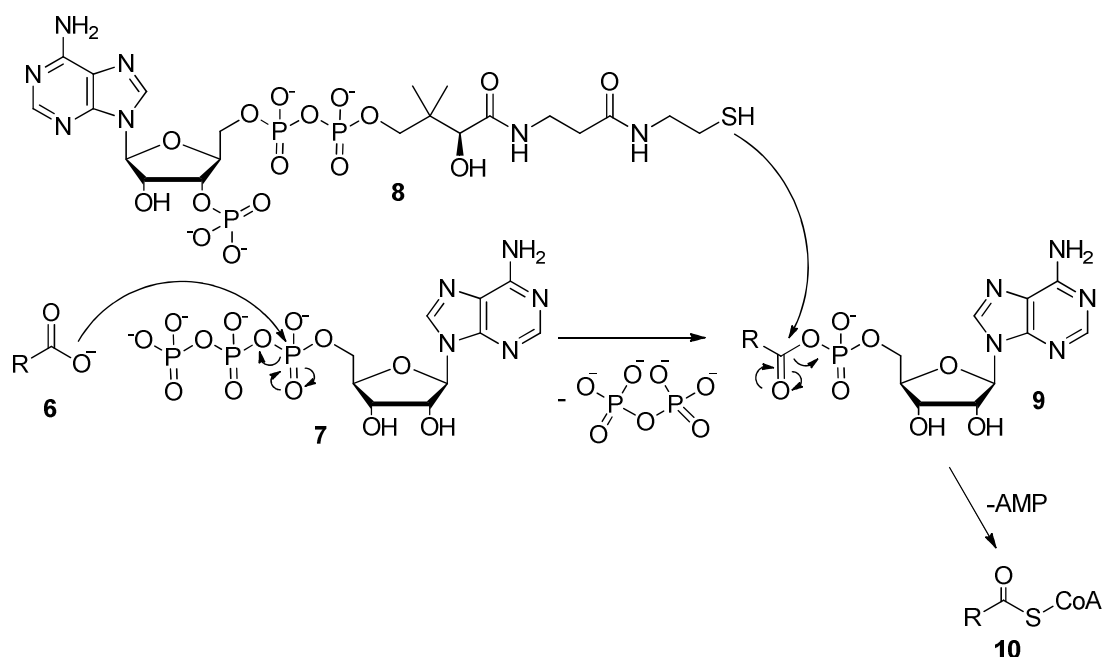


Abbildung 2: Bildung des CoA-Esters 10.

Als Substrate werden bei den PKS, im Gegensatz zu den Fettsäuresynthasen (FAS), weit mehr Bausteine akzeptiert. Während FAS nur Acetyl (**11**)- und Malonylbausteine (**12**) verwenden, werden bei PKS auch Isopropyl (**13**)-, Benzyl (**14**)-, Propyl (**15**)-, Butyl (**16**)-, und Methylmalonyl (**17**)-CoA-Ester verwendet (Abbildung 3).

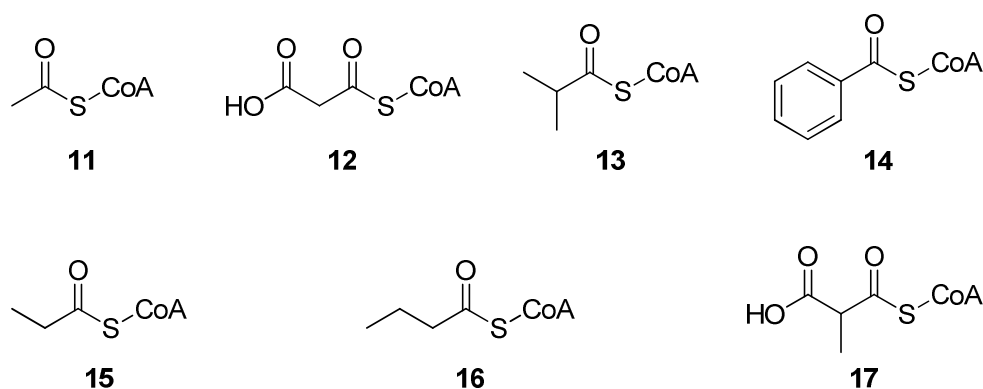


Abbildung 3: Bausteine der PKS-Biosynthese 11–17.

Für eine funktionierende Biosynthese müssen die CoA-Ester über einen 4'-Phosphopantethein-Linker (PPant) an ein aktiviertes Acylcarrierprotein (ACP) gebunden sein. Das ACP bindet über einen Serinrest den PPant-Arm über eine posttranslationale Modifikation. Dadurch wandelt sich die *apo*-Form des ACP in die

aktivierte *holo*-Form um. Katalysiert wird der Prozess durch eine Phosphopantetheinyltransferase (PPTase) (Abbildung 4).⁷ Im Folgenden wird der Phosphopantetheinyllinker als geschlängelte Linie dargestellt.

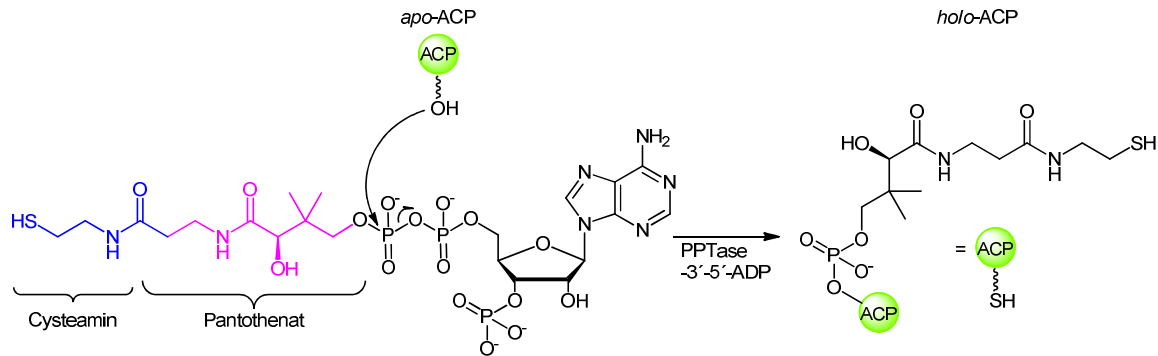


Abbildung 4: Aktivierung der ACP mittels Phosphopantetheinyl.

Die Verlängerung der Polyketidkette erfolgt über eine Claisen-artige Thioesterkondensation. (Abbildung 5).⁸

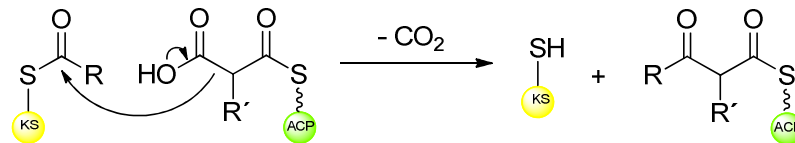


Abbildung 5: Claisen-artige Bindungsknüpfung in Polyketidsynthesen; geschlängelte Linie: 5'-Phosphopantetheinylarm.

Die Acyltransferase (AT) ist hierbei für die Auswahl der aktivierten Verlängerungseinheit, z.B. Malonyl- oder Acetyl-CoA verantwortlich und überträgt den Acylrest des CoA-Esters auf das aktivierte Acylcarrierprotein (ACP). Nach der Übertragung der wachsenden Polyketidkette auf die Ketosynthase (KS) katalysiert diese die Verknüpfung der beiden Einheiten (Abbildung 6).³ Das am ACP gebundene Intermediat greift nukleophil an der wachsenden Kette an und durch eine Decarboxylierung entstehen ein Thiol und die um eine Einheit verlängerte Kette, die nach der Reaktion am Acylcarrierprotein gebunden ist.

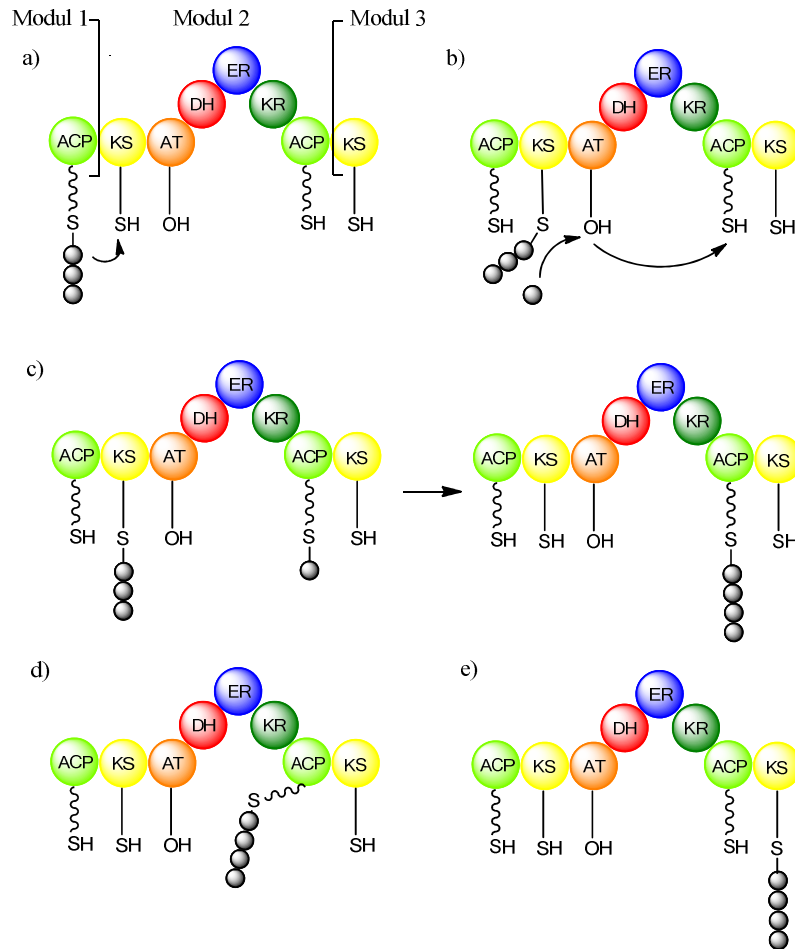


Abbildung 6: a) Die Polyketidkette wird vom ACP auf die KS des nächsten Moduls übertragen; b) die AT wählt eine Verlängerungseinheit aus und überträgt diese auf das ACP; c) die KS katalysiert die Verknüpfung der beiden Moleküle; d) das entstandene Molekül durchläuft die optionalen Reduktionsschritte; e) die um eine Einheit verlängerte Kette wird auf die KS des nächsten Moduls übertragen; die Reaktionspfeile deuten in Richtung der Bewegung der wachsenden Kette und stehen nicht für Elektronenbewegungen.³

Die große strukturelle Vielfalt wird durch optionale Domänen erreicht, die Modifikationen vornehmen: So gibt es Ketoreduktasedomänen (KR), die für eine Reduktion der entstandenen Ketofunktion zum Alkohol verantwortlich sind. Weiterhin existieren Dehydratasedomänen (DH), die den Alkohol dehydratisieren und Enoylreduktasedomänen (ER), die eine gesättigte Verbindung generieren (Abbildung 7).³

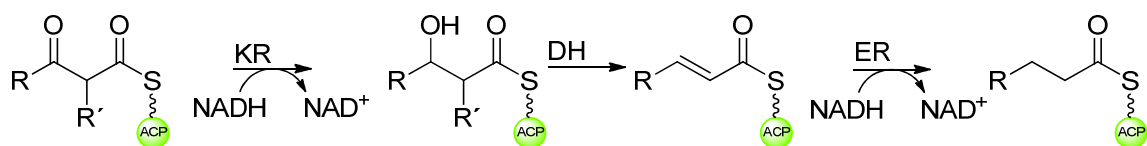


Abbildung 7: Post-PKS-Funktionen.

Zum Abschluss der Kettenverlängerung wird das Intermediat schließlich durch die Thioesterase (TE) hydrolytisch oder cyclisierend vom Protein gelöst.

Weitere putative Domänen stellen die Pyransynthesen (PS) dar, deren postulierte Funktion in Abbildung 8 gezeigt ist.

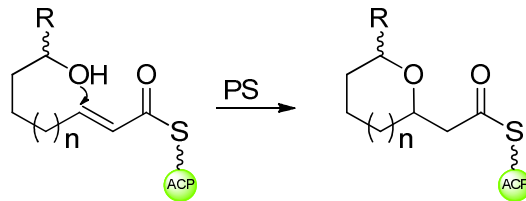


Abbildung 8: Putative Funktion der Pyransynthase; $n = 0,1$; die PS katalysiert eine Ringschlussreaktion zum Lacton.

1.1.3 Arten von Polyketidsynthasen

Es gibt drei verschiedene Arten von PKS, Typ I, II und III. Diese unterscheiden sich im Aufbau und der Anordnung der Enzyme (Abbildung 9).⁹

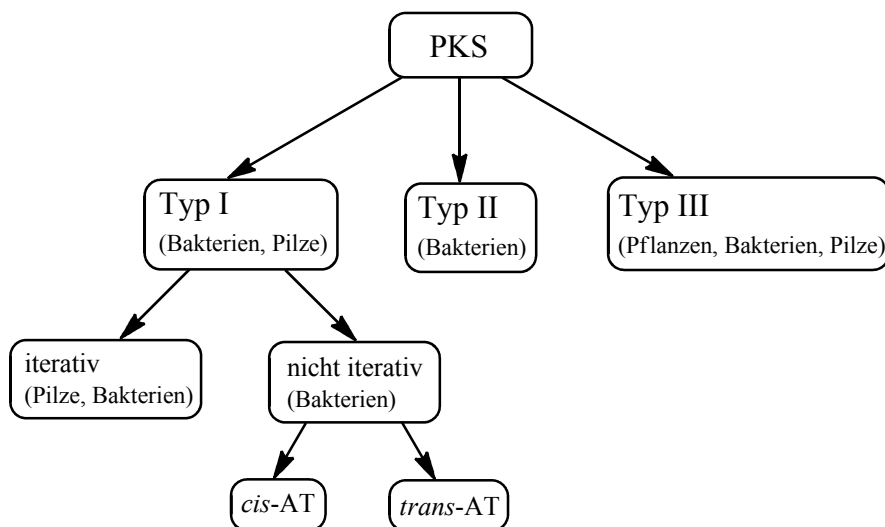


Abbildung 9: Klassifizierung der PKS.

Typ I PKS sind in der Regel für die Biosynthese komplexer Polyketide in Bakterien und Pilzen verantwortlich. Die katalytischen Komponenten in diesen PKS sind kovalent miteinander verbunden und bilden sich wiederholende Einheiten, sogenannte Module, die für den Aufbau der Kette zuständig sind. Es existieren verschiedene Modulvarianten, die

die wachsende Polyketidkette auf unterschiedliche Weise modifizieren können. Auch die Startereinheiten können je nach Aufbau der PKS variieren. So gibt es PKS, die die Biosynthese mit Acetyl-, Propionyl-, Malonyleinheiten oder deren substituierten Analoga initiieren.¹⁰

Als typische Modell-PKS zeichnet sich die 6-Deoxyerythronolid B-Synthase (DEBS) aus. Diese PKS produziert 6-Deoxyerythronolid B (6dEB) (**18**), den Vorläufer des Antibiotikums Erythromycin A (**1**). Sie ist die derzeit am besten untersuchte modulare Typ I-Polyketidsynthase^{11,12} und anhand dieser lässt sich die Funktion einer Typ I-PKS besonders anschaulich darstellen.¹³ 6dEB (**18**) entsteht durch die Verknüpfung von Propionat- (**19**) und Methylmalonyleinheiten (**20**).

Die PKS besteht aus drei großen Polypeptideinheiten (DEBS 1, 2 und 3) von denen jede zwei Module beinhaltet (Abbildung 10). Diese Module sind verantwortlich für die Verlängerung der bereits bestehenden Kette um jeweils eine Einheit. Die Module reichen die wachsende Kette weiter und verknüpfen dabei die einzelnen Einheiten zu dem Endprodukt 6dEB (**18**). In DEBS 1 ist zusätzlich das Lademodul integriert, das in der Lage ist, selektiv das passende Startermolekül (in diesem Fall eine Propionyleinheit) auszuwählen und aufzuladen, DEBS 3 enthält eine terminale TE, die die Polyketidkette als Makrolakton vom Enzymkomplex freisetzt. In jedem Modul befinden sich eine KS, eine AT und ein ACP. Die KS binden an die bereits synthetisierte Kette und katalysieren die Verlängerung mit den Methylmalonyleinheiten (**20**). Diese werden zuvor von den AT ausgewählt und auf das entsprechende ACP des gleichen Moduls übertragen. Für nachfolgende Schritte sind KR, DH oder ER verantwortlich (Abbildung 10).

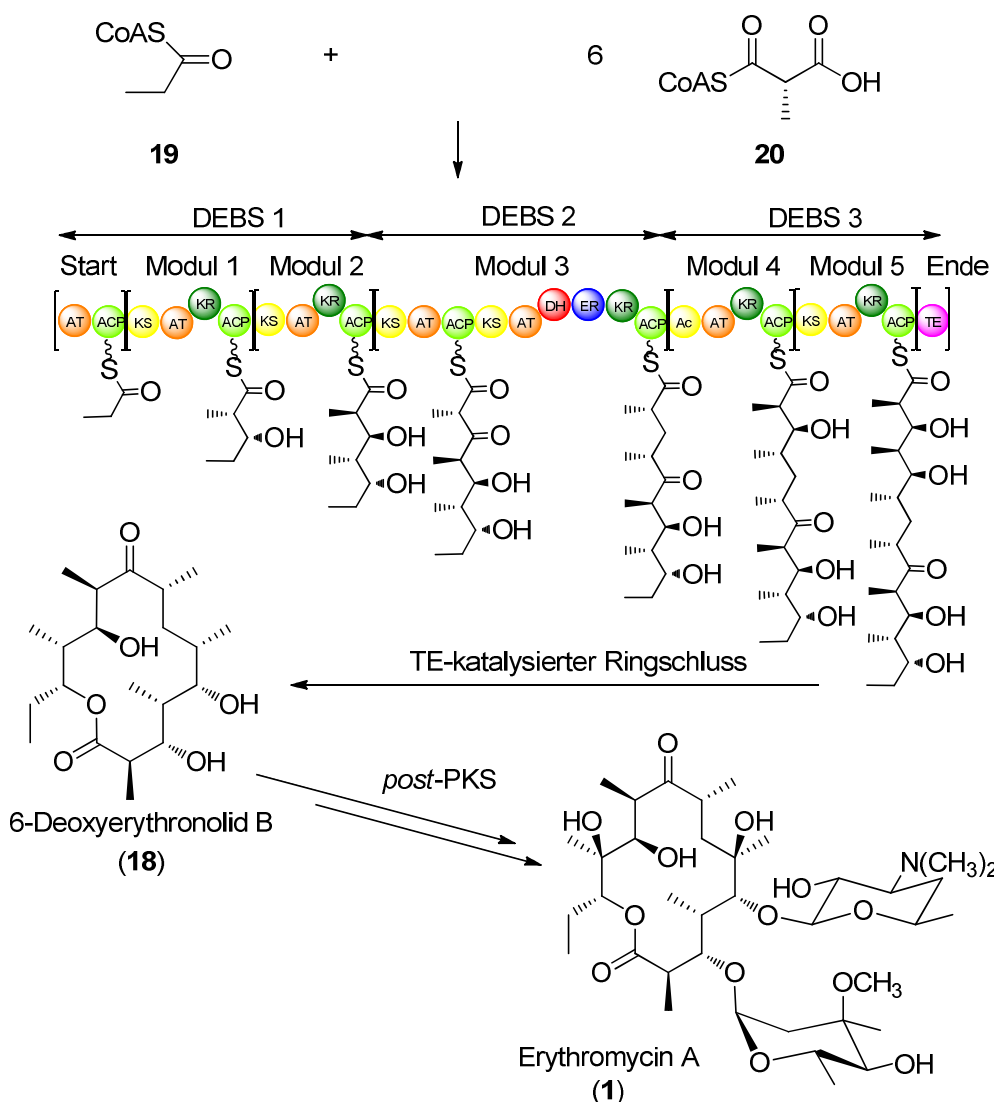


Abbildung 10: Biosyntheseweg des Erythromycin A (1).

Eine wichtige Unterscheidung bei PKS besteht auch in der Art der Katalyse. Es wird unterschieden, ob eine Enzymeinheit mehr als eine Verlängerungsrunde katalysiert (iterativ) oder nicht (modular).^{14,6} Der Reduktionsgrad der einzelnen Verlängerungsschritte kann bei der iterativen Variante variieren, da optionale Enzyme, wie z.B. Ketoreduktasen, Enoylreduktasen, Dehydratasen oder Methyltransferasen nicht bei jeder Verlängerungsrunde aktiv sind. Die determinierenden Faktoren für diese partielle Domäneninaktivität sind bislang größtenteils nicht bekannt.

Im Falle der modularen, nicht iterativen PKS existiert eine enge Korrelation zwischen der Enzymarchitektur und der Struktur des Polyketids (siehe Abschnitt 1.1.2). Aufgrund dieses Kolinearitätsprinzips kann mit Hilfe der Enzymsequenz die Struktur des synthetisierten Moleküls bestimmt werden. Auch die umgekehrte Voraussage ist möglich.

Iterative PKS sind in Pilzen zu finden, ein Beispiel hierfür ist die Biosynthese von Lovastatin (**4**) durch *Aspergillus terreus*.¹⁵ Das im Gencluster enthaltene 335 kDa große Enzym LovB ist eine iterative PKS und enthält KS-, AT-, DH-, MT-, KR- und ACP-Domänen (Abbildung 11).¹⁶

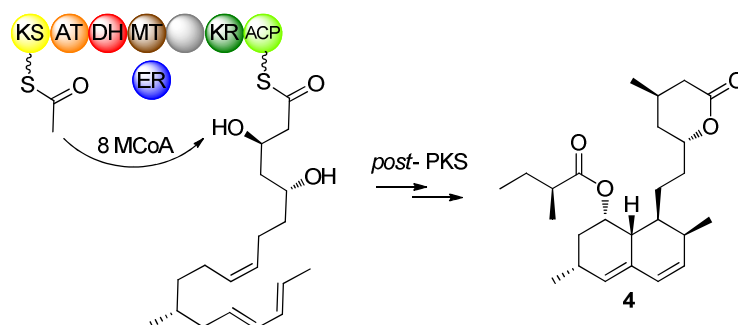


Abbildung 11: Beispiel einer iterativen Typ I PKS an der Lovastatin (**4**)-Biosynthese.

Typ II PKS bestehen aus nichtkovalent assoziierten Multienzymkomplexen, die aromatische Polyketide in Bakterien erzeugen.¹⁴ Gram-positive Actinomyceten sind, bis auf wenige Ausnahmen, die einzige bekannte Gruppe von Organismen, die diese Art der Polyketide produzieren.^{17,18} Die Typ II PKS bestehen aus einem kleinen Satz an iterativ genutzten Enzymen, die jedes für sich von voneinander separierten Genen exprimiert wird. Diese sogenannte „minimal PKS“ besteht in der Regel aus zwei KS-Einheiten und einem ACP, das als „Anker“ für die wachsende Polyketidkette dient. Abgesehen von ein paar Ausnahmen stehen die Gene, die für diese Proteine codieren, zusammen und bilden eine typische $KS_{\alpha}/KS_{\beta}/ACP$ Architektur. Weitere PKS-Domänen, wie Ketosynthasen, Cyclasen und Aromatasen bestimmen die abschließende Struktur des entstehenden Polyketids.¹⁹ Ein Beispiel für eine Typ II PKS ist die Biosynthese des Daunorubicins (**21**) (Abbildung 12), das anticancerogen wirkt.

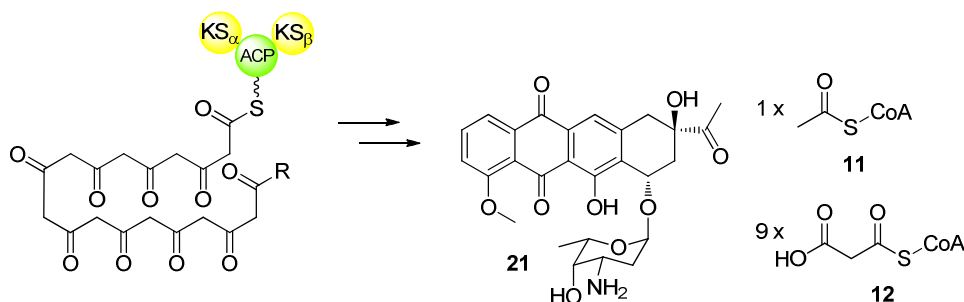


Abbildung 12: Funktion einer Typ II-PKS am Beispiel von Daunorubicin (**21**).

Chalcon-/Stilbensynthasen sind eine große Gruppe der Typ III PKS und kommen hauptsächlich in Pflanzen vor. Diese Art der Polyketidsynthasen unterscheiden sich sowohl strukturell als auch mechanistisch erheblich von den PKS vom Typ I und II. Typ III-PKS nutzen freie CoA-Thioester als Substrate, Typ I und Typ II PKS benutzen dagegen Acyl-Carrier-Protein-gebundene Acylreste zum Aufbau der Polyketidkette.²⁰ Typ III PKS sind einfach aufgebaut und bestehen aus einem Homodimer aus KS-Domänen.²¹ Sie katalysieren typischerweise die iterative Decarboxylierung von mehreren Malonyl-CoA-Estern **12** und formen so ein Polyketomethylenintermediat, das eine weitere Decarboxylierung in Verbindung mit einer Cyclisierung über eine Claisen- und/oder Aldolreaktion zum Endpolyketid durchläuft. Typische Produkte von Typ III PKS sind aromatische und cyclische Polyketide.²² Ein Beispiel für eine Typ III-PKS ist die Naringeninchalcon (**22**)-PKS (Abbildung 13).

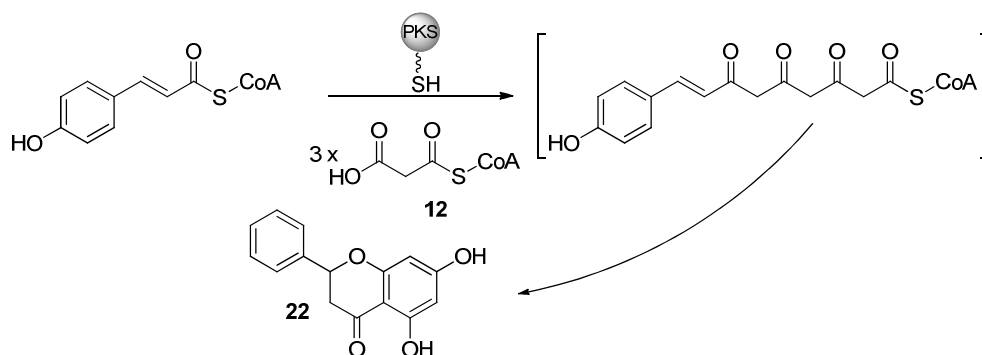


Abbildung 13: Typ III-Polyketidsynthase am Beispiel des Naringeninchalcon (**22**).

1.1.4 Strukturen von Polyketidsynthasen

Die aktiven Zentren, die für den Aufbau der Polyketide verantwortlich sind, sind in Modulen organisiert und diese sind wiederum zu langen Polypeptiden verbunden. Jedes PKS-Protein liegt als Dimer vor, und die beiden Kopien sind über die KS-, ACP- und AT-Domänen assoziiert.²³ Alle Domänen befinden sich in der Nähe des entsprechenden ACPs, um eine effiziente Verlängerung und Modifikation des entstehenden Intermediats zu gewährleisten. Es wird vermutet, dass die dreidimensionale Struktur einer Doppelhelix ähnelt, bei der sich die KS-, AT-, ACP- und TE-Domänen in der Mitte der Struktur befinden (Abbildung 14).²³

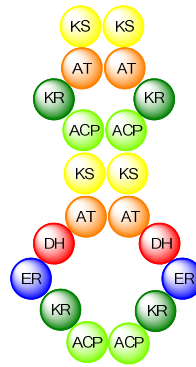


Abbildung 14: Doppelhelix der PKS.

Die reduktiven KR-, DH- und ER-Domänen liegen an der Peripherie des Proteinkomplexes. Zwischen den Domänen befinden sich sogenannte „Linker“,²⁴ die eine Länge von 20 bis 250 Aminosäuren haben. Für die Erkennung der Proteine untereinander wiederum sind die Docking-Domänen²⁵ verantwortlich. Diese sind nicht nur an der Verbindung der Untereinheiten beteiligt, sondern auch an der Dimerisierung der PKS-Proteine.²⁵

1.1.5 *Trans*-AT Polyketidsynthasen

Eine Ausnahme unter den modularen PKS, bei der die Architektur der modularen Polyketidsynthase in Bezug auf die Kolinearitätsregel nicht mit der Struktur des aufgebauten Moleküls übereinstimmt, bilden die *trans*-AT-PKS.²⁶ Bei diesen Enzymen besitzen die Module keine eigenen AT-Domänen sondern erhalten ihre Acyleinheiten von freistehenden AT. Von diesen AT-Enzymen werden im Gencluster nur eine bis drei codiert, die die Acylierung iterativ katalysieren, manchmal auch in Verbindung mit einer *trans*-ER Domäne²⁷ (Abbildung 15). Dieselben AT übertragen die Bausteine, aus denen das Polyketid gebildet wird, auf mehr als ein Modul.²⁸



Abbildung 15: Ausschnitt aus einem PKS-Gencluster zur Verdeutlichung des Unterschiedes zwischen *cis*- und *trans*-AT-PKS.

Da die *trans*-AT-Domänen in den meisten Fällen Malonylreste übertragen, werden α -Methylierungen von Methyltransferasedomänen (MT) katalysiert. Ein Unterschied zu *cis*-AT PKS Systemen besteht in der größeren Modulvielfalt in *trans*-AT PKS. Während in *cis*-AT PKS Systemen bislang nur acht verschiedene Hauptarchitekturen von Modulen gefunden wurden, sind bei den *trans*-PKS bereits mehr als 50 Modulanordnungen mit teils neuartigen Domänen bekannt. Aufgrund dieses Unterschieds können Regeln für *cis*-AT PKS, wie z.B. die Kolinearitätsregel, in den meisten Fällen nicht auf *trans*-AT PKS übertragen werden.²⁹

Anhand phylogenetischer Untersuchungen wurde gezeigt, dass sich die beiden PKS-Arten evolutiv unabhängig entwickelt haben.³⁰ Die erste Entdeckung einer *trans*-AT-PKS war der PKS-Gencluster von *Bacillaen*, dessen Funktion zu der Zeit noch unbekannt war.³¹ Das erste bekannte Produkt einer *trans*-AT PKS war Pederin.³²

1.2 Nichtribosomale Peptidsynthetasen

Die meisten Peptide und alle Proteine werden in Organismen am Ribosom hergestellt.³³ Im Falle der nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) jedoch ist dieser Mechanismus vom Ribosom unabhängig. NRPS zeigen sich für die Produktion verschiedenster Metabolite verantwortlich, die eine wichtige Bedeutung in der Medizin besitzen (Abbildung 16).³⁴

Die strukturelle Vielfalt der Substanzen ist groß, da die NRPS neben den 20 proteinogenen auch nicht-proteinogene Aminosäuren in die Struktur einbauen können. Bislang sind etwa 500 nicht-proteinogene Aminosäuren bekannt, von denen etwa 96% zur Biosynthese nicht-ribosomaler Peptide verwendet werden.³⁵ Wie in PKS werden auch in NRPS diese Substanzen über große Enzymkomplexe im Sekundärmetabolismus von Bakterien und Pilzen dargestellt.³⁶

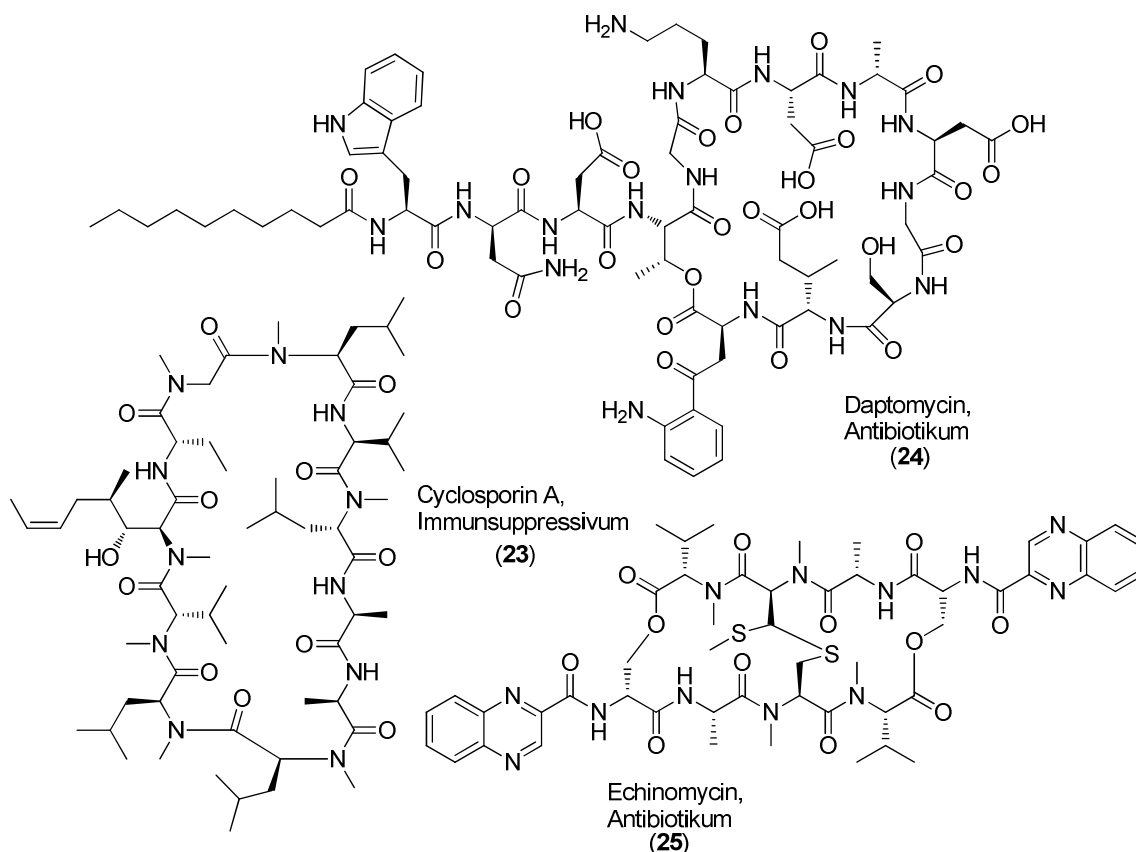


Abbildung 16: Medizinisch relevante NRPS-Produkte; Cyclosporin A (23), Daptomycin (24) und Echinomycin (25).

Das Minimalmodul von NRPS besteht aus einer Kondensationsdomäne (C), einer Adenylierungsdomäne (A) und einem Peptidyl-carrierprotein (PCP/T). Abgespalten wird die Kette am Ende in den meisten Fällen durch eine Thioesterase (TE). Die A-Domäne katalysiert eine zweistufige, ATP-abhängige Reaktion, die zuerst die Carboxylgruppe der Aminosäure als ein Aminoacyl-AMP Intermediat aktiviert und dieses anschließend auf die benachbarte PCP-Domäne überträgt (Abbildung 17).

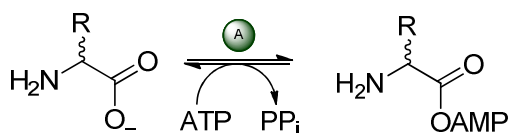


Abbildung 17: Durch die A-Domäne katalysierte Bindungsbildung zwischen ATP und Aminosäure; die Carboxylgruppe der Aminosäure wird als Aminoacyl-AMP aktiviert.

Analog zum ACP in der PKS-Biosynthese muss das PCP posttranslational aktiviert werden. Die Phosphopantetheinylierung eines konservierten Serinrestes des PCP überführt die inaktive *apo*-PCP in die aktive *holo*-PCP,³⁷ die das Substrat durch

nukleophilen Angriff der Thioleinheit am aktivierten Carbonylkohlenstoff kovalent bindet. Hierbei wird AMP abgespalten (Abbildung 18).³⁸

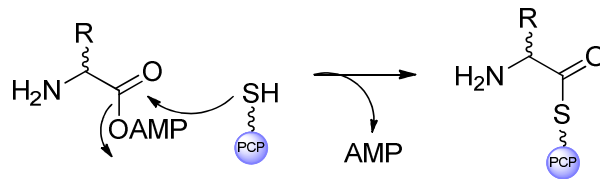


Abbildung 18: Funktion der PCP-Domäne; Verknüpfung mit der Aminosäure durch nukleophilen Angriff der Thiolgruppe.

C-Domänen befinden sich am Anfang jedes NRPS-Moduls mit Ausnahme des Lademoduls. Sie katalysieren die Bildung der Peptidbindung zwischen zwei PCP gebundenen Intermediaten (Abbildung 19). C-Domänen besitzen eine Akzeptor- und eine Donorseite und damit, neben der A-Domäne, eine zusätzliche Möglichkeit der Spezifikation innerhalb der NRPS. Die Akzeptorseite hat eine geringe Spezifität für das PCP-gebundene Nukleophil. Diese ist nicht stark ausgeprägt, kann jedoch als weitere Kontrolle der Synthese mitwirken.^{39,40}

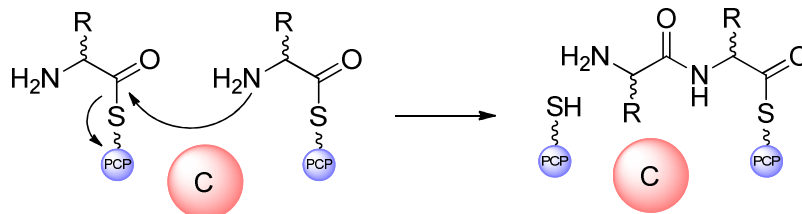


Abbildung 19: Die Kondensationsdomäne katalysiert die Bindungsknüpfung zwischen zwei Substraten.

Die TE-Domäne befindet sich normalerweise am Ende des letzten NRPS-Moduls - und katalysiert entweder die Hydrolyse der entstandenen Kette oder eine intramolekulare Cyclisierung (Abbildung 20).

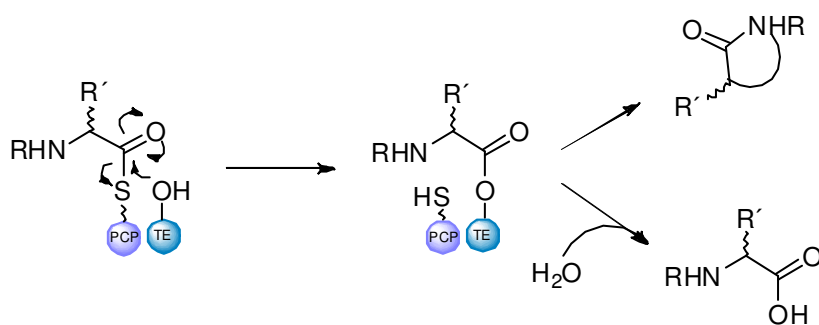


Abbildung 20: Abspaltung der Kette von der NRPS durch die TE-Domäne, das Polyketid kann als offenkettige Säure oder durch Makrocyclisierung freigesetzt werden.

Neben den drei Hauptdomänen (A, C, PCP) eines NRPS-Moduls können auch weitere Domänen vorhanden sein, die die wachsende oder bereits abgespaltene Kette modifizieren.^{41,42} Eine *N*-Methyltransferase katalysiert die Übertragung eines Methylrestes auf ein Stickstoffatom innerhalb des Moleküls,⁴³ Epimerasen wandeln L-konfigurierte Aminosäuren in die jeweilige D-Form um.^{44,45} Cyclasen sind für einen intramolekularen Angriff von freien Hydroxy- oder Aminofunktionen auf benachbarte Carbonylfunktionen verantwortlich und katalysieren so einen Ringschluss. Durch anschließende Dehydratisierung werden Heterozyclen gebildet, die anschließend von Oxidasen zu den entsprechenden Heteroaromaten oxidiert werden können.^{46,47} Durch Halogenasen werden Halogene eingebaut und Formyltransferasen katalysieren die Formylierung freier Aminofunktionen.

1.2.1 NRPS-PKS Hybride

Es gibt eine große Ähnlichkeit in der Organisation und Funktion der Arbeitsweise zwischen PKS und NRPS. Aus diesem Grund sind diese Gencluster in der Lage, Hybride auszubilden.⁴⁸

Der erste entdeckte PKS-NRPS-Hybrid-Gencluster war der des Rapamycins (**5**) aus *Streptomyces hygroscopicus*. Dieser Gencluster enthält ein NRPS-Modul, das für die Einführung von Pipecolinsäure in die Polyketidstruktur verantwortlich ist.⁴⁹ Pederin,³² Psymberin⁵⁰ und Bacillaen⁵¹ werden ebenfalls durch PKS-NRPS-Hybride gebildet. Bleomycin (**26**), ein klinisch angewendetes Antitumor-Mittel, ist das gegenteilige Beispiel: es wird durch eine NRPS gebildet, die in ihrer Mitte ein PKS-Modul enthält (Abbildung 21).⁵²

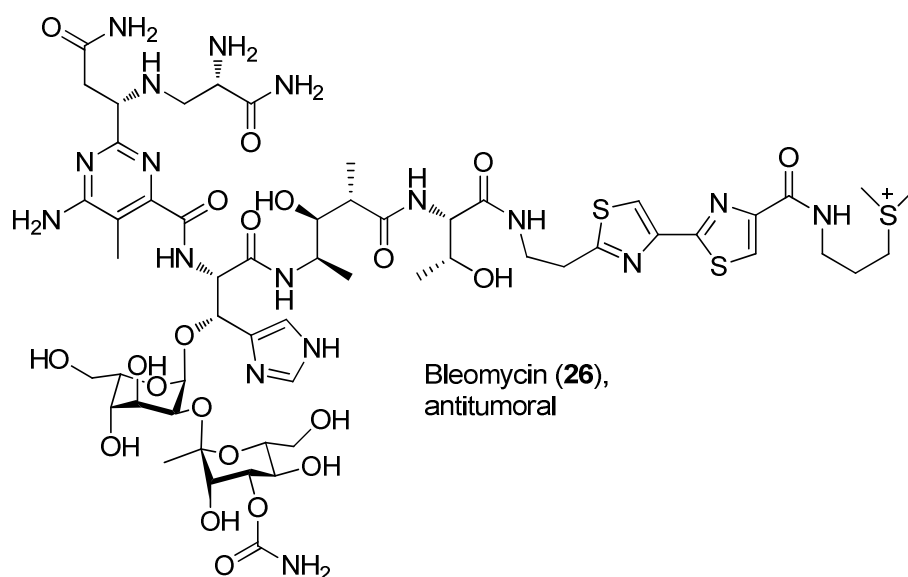


Abbildung 21: Struktur von Bleomycin (26), Produkt eines PKS-NRPS-Hybrid-Genclusters.

1.3 Beispiele von für diese Arbeit wichtigen Naturstoffen und deren Biosynthese

In den nachfolgenden Unterkapiteln werden für diese Arbeit relevante Naturstoffe, ihre Struktur, Entdeckung sowie postulierte Biosynthesewege der Substanzen aufgezeigt und beschrieben.

1.3.1 Psymberin (27) und dessen Biosynthese

Psymberin/Irciniastatin A (**27**) wurde 2004 unabhängig von den Arbeitsgruppen um Phillip Crews⁵⁰ und George R. Pettit⁵³ aus Extrakten von Schwämmen der Gattungen *Psammocinia* und *Ircinia ramosa* (Abbildung 22) isoliert. Der Sekundärmetabolit **27** besitzt eine hohe Zytotoxizität gegen verschiedene Haut-, Brust- und Darmkrebszelllinien.⁵³ Aufgrund dieser Wirkung erfolgte eine breite Forschung auf dem Gebiet des Psymberins (**27**).

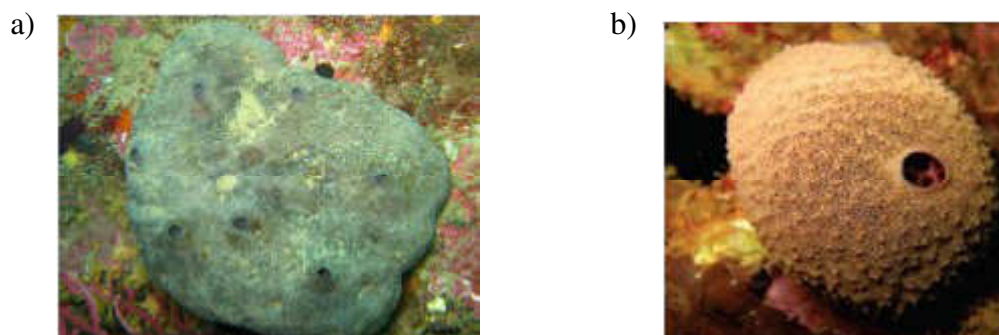


Abbildung 22: a) *Irinia oros* (naher Verwandter von *Irinia ramosa*)⁵⁴; b) *Psammocinia* aff. *bulbosa*⁵⁵.

Beide Substanzen stellten sich nach der vollständigen Strukturaufklärung durch die Arbeitsgruppe um Jef K. De Brabander 2005 als identisch heraus.⁵⁶ Für die vollständige Charakterisierung war die Substanzmenge aus 600 Schwammextrakten von *Psammocinia* aff. *bulbosa* nötig, die aus einem Zeitraum von 11 Jahren Arbeit gewonnen worden waren (Abbildung 23).⁵⁰ In der Literatur wurden bislang acht verschiedene Totalsynthesen für Psymberin (**27**) beschrieben.^{56,57,58,59,60,61,62,63}

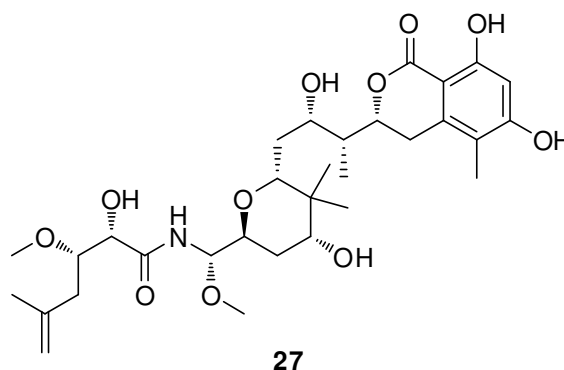


Abbildung 23: Struktur von Psymberin (**27**).

Psymberin (**27**) besitzt neun Stereozentren, eine geminale Dimethylgruppe sowie eine Dihydroisocumarineinheit. Über eine Amidbindung ist eine Tetrahydropyranyleinheit mit einer 2-Hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-ensäure verbunden. Die Konfiguration der Amidseitenkette wurde durch Vergleiche ähnlicher Substanzen als *anti* bestimmt.⁶⁴

Psymberin (**27**) ist ein Mitglied der Pederinfamilie. Das PederinGrundgerüst zeichnet sich bei fast allen Vertretern durch zwei Pyranringe aus, die über eine Amidbindung verbunden sind. Weitere Vertreter dieser Familie sind Pederin (**28**) und Onnamid A (**29**) (Abbildung 24).

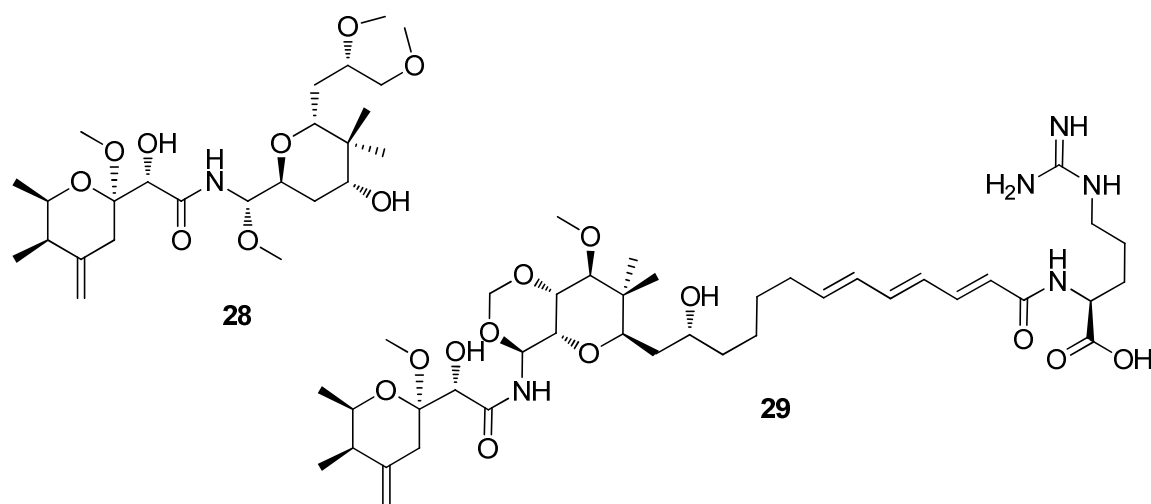


Abbildung 24: Strukturen von Pederin (28) und Onnamid A (29).

Pederin (28) und Onnamid A (29) unterscheiden sich von Psymberin durch die nur im Psymberin (27) vorhandene Dihydroisocoumarineinheit, auch fehlt im Psymberin (27) das Ringsystem im Carboxylfragment.

Um Struktur-Wirkungsbeziehungen aufklären zu können, wurden von De Brabander *et al.* 2006 Psymberin/Pederin Chimären synthetisiert und gezeigt, dass die Dihydroisocoumarineinheit in Psymberin (27) eine wesentliche Rolle bei der anticancerogenen Wirkung spielt.⁶⁵ So war ein dargestelltes Analogon ohne diese Einheit um ein tausendfaches weniger aktiv als Psymberin (27). Ebenso wurde durch diese Hybridsubstanz gezeigt, dass das Ringsystem im Carboxylfragment, das Onnamid A (29) und Pederin (28) gemeinsam ist, eine wichtige Rolle für die zytotoxische Aktivität dieser Substanzen spielt. 2009 wurde von Huang *et al.*⁶⁶ gezeigt, dass die Stereozentren an C8 und C9 ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Wirkung von Psymberin (27) spielen. Diese Arbeitsgruppe untersuchte auch die Wirkung der psymberineigenen 2-Hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-ensäure. Hierbei stellte sich heraus, dass die Substitution an C4/C5 nötig, die terminale Doppelbindung nicht relevant und die Hydroxygruppe an C11 sogar nachteilhaft für die Aktivität sind.⁶⁶

Piel *et al.* zeigten 2009 durch Isolation des Psymberin Genclusters, dass dieser nicht zum Schwamm gehört, sondern zu einem bakteriellen Symbionten.⁶⁷ Jedoch ist das Psymberin-produzierende Bakterium mit dem jetzigen Stand der Technik nicht kultivierbar, so dass letztendlich ein metagenomischer Ansatz zur Isolierung des Genclusters führte. Der für die Psymberin-Biosynthese verantwortliche Gencluster wurde aus metagenomischer DNA des Schwammes *Psammocinia* aff. *bulbosa* erhalten.

Gesammelt wurden die Schwämme in Papua Neuguinea. Die Isolierung der Gene stellte eine gewaltige Herausforderung dar, da in Schwämmen eine enorme Diversität an symbiontischen Mikroorganismen herrscht.^{68,69} Hierbei wurden degenerierte Primer entworfen, um KS-Genfragmente per Polymerase-Kettenreaktion (PCR, siehe Abschnitt 4.2.6.1) zu amplifizieren. Die erhaltenen Genfragmente wurden sequenziert. Über eine Phylogenie-basierte Strategie wurde das korrekte PCR-Produkt identifiziert und mit Sequenzinformationen des gesamten Genclusters schließlich aus einer metagenomischen Cosmidbibliothek aus 410.000 Klonen isoliert werden (Abbildung 25 und Abbildung 26).⁶⁷ Der Gencluster codiert zwei große Enzymkomplexe, PsyA und PsyD, die für die Biosynthese des Polyketidgrundgeüsts verantwortlich sind. PsyD ist der bisher größte bekannte Enzymkomplex. Es existieren zehn enzymatische Module, unter anderem als viertes Modul ein NRPS-Modul, das für den Einbau von Glycin in die Struktur verantwortlich ist.

Im Gencluster von Psymberin sind einige ungewöhnliche Proteine codiert. Eine Besonderheit von *trans*-AT-Systemen befindet sich direkt im Lademodul: Die Initiierung der Biosynthese findet nicht, wie in *cis*-AT-PKS, über eine AT statt, sondern über eine GCN5-verwandte *N*-Acetyltransferase- (GNAT) Domäne. Diese Besonderheit wird aufgrund der Ähnlichkeit der GNAT-Domäne mit einer homologen Domäne im Pederin-Biosyntheseweg vermutet. Es konnte für den Naturstoff Curacin A gezeigt werden, dass diese Domäne in der Lage ist, sowohl Acetyl-CoA als auch Malonyl-CoA zur Einleitung der Biosynthese zu verwenden, da sie Malonylreste decarboxyliert.⁷⁰

EINLEITUNG

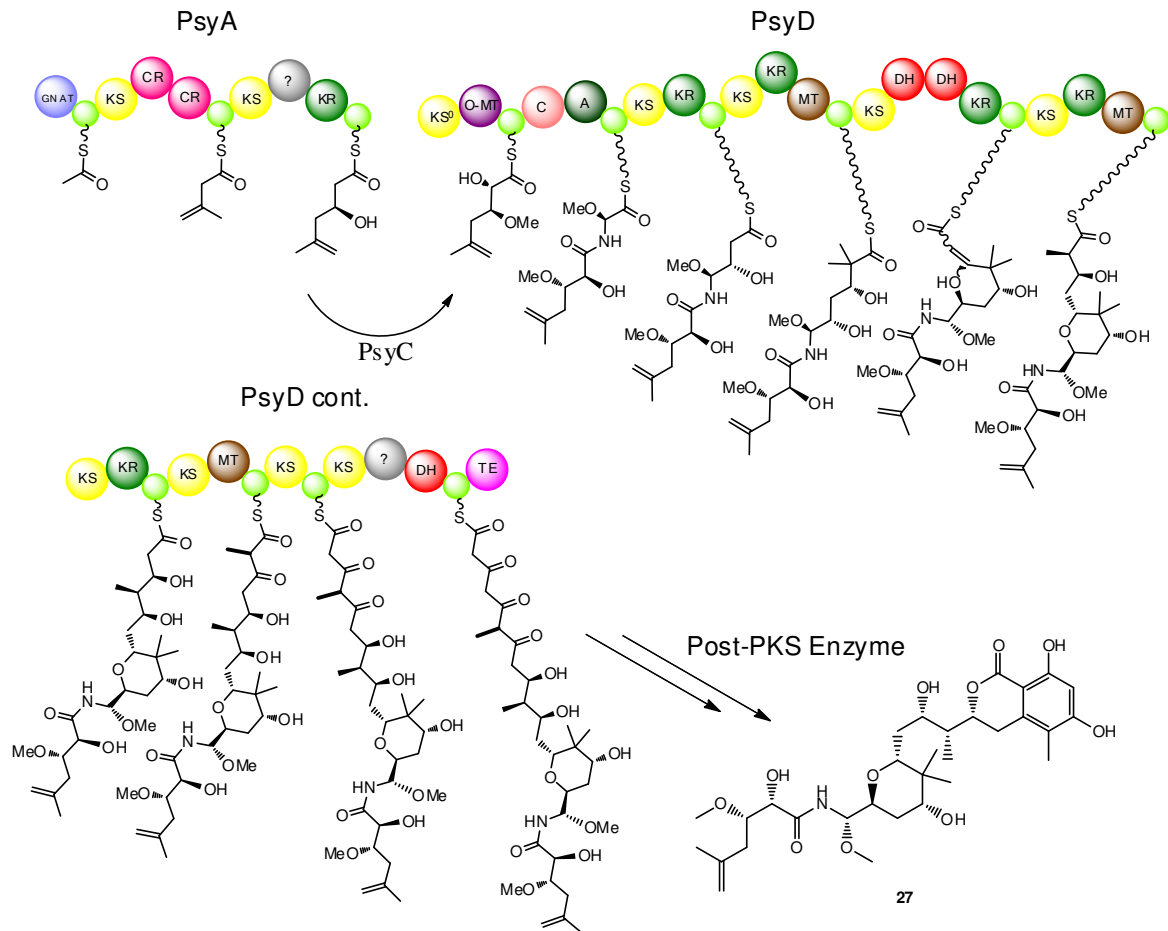


Abbildung 25: Psymberin-Biosynthese durch einen PKS-NRPS-Hybrid; GNAT: ist verwandt mit der GCN5 Familie; CR: Crotonase; KS⁰: nicht-elongative KS; O-MT: O-Methyltransferase; MT: Methyltransferase; ?: unbekannt.

ORF	Proteingröße	vermutete Funktion	homologes Protein	% Ähnlichkeit
ORF1	302	Zn-abhängige Hydrolase	Ssed_2823, <i>Shewanella sediminis</i> HAW-EB3	35
ORF2	426	Adenylosuccinatsynthetase	AdsS, <i>Reineka</i> sp. MED297	53
ORF3	367	Transposase	SYNPCC7002_GO032, <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	43
psyA	3.297	PKS	PedI, <i>Paederus fuscipes</i> Symbiont	40
psyB	331	Methyltransferase	PedA, <i>Paederus fuscipes</i> Symbiont	51
psyC	343	PedK-ähnlich	OnnF, <i>Theonella swinhoei</i> Symbiont	41
ORF4	367	Transposase	SYNPCC7002_GO032, <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	43
ORF5	491	Transposase	GobsU_25714, <i>Gemmata obscuriglobus</i> UQM 2246	47
psyD	12.644	PKS-NRPS	PedF, <i>Paederus fuscipes</i> Symbiont	43
psyE	571	Phosphoenolpyruvatsynthase β + γ Untereinheit	β: ORF13, <i>Discodermia dissoluta</i> Symbiont γ: ORF11, <i>Discodermia dissoluta</i> Symbiont	92 93
psyF	497	Phosphoesterase ähnlich	ORF10, <i>Discodermia dissoluta</i> Symbiont	95
psyG	309	Phosphoenolpyruvatsynthase α Untereinheit	ORF9, <i>Discodermia dissoluta</i> Symbiont	95
psyH	369	Acyltransferase	ORF8, <i>Discodermia dissoluta</i> Symbiont	93
psyI	440	HMG-CoA-Synthase	ORF7, <i>Discodermia dissoluta</i> Symbiont	97
psyJ	254	Crotonase Superfamilie	ORF6, <i>Discodermia dissoluta</i> Symbiont	94
psyK	367	Flavin-abhängige Oxygenase	ORF5, <i>Discodermia dissoluta</i> Symbiont	96
psyL	81	ACD	ORF4, <i>Discodermia dissoluta</i> Symbiont	97
psyM	429	3-Oxoacyl ACP Synthase	ORF3, <i>Discodermia dissoluta</i> Symbiont	95
psyN	709	Kationen-Transport ATPase	ORF2, <i>Discodermia dissoluta</i> Symbiont	95
ORF6 (zum Teil)		unbekannt	GZ18F2_26, unkultiviertes Archaeon Gzfos18F2	31

Abbildung 26: Überblick über die Gene des Genclusters von Psymberin, markiert: ungewöhnliche Gene, die die Proteine PsyD, PsyC und PsyK codieren.

Weitere interessante Enzyme agieren später in der Biosynthese. So gibt es eine putative *O*-Methyltransferase und zwei putative α -Hydroxylasen (Abbildung 27).

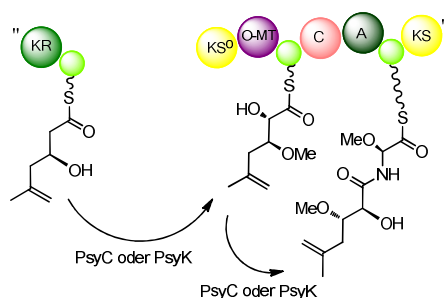


Abbildung 27: Ausschnitt aus der Biosynthese von Psmberin (27): PsyC/PsyK: putative α -Hydroxylasen, PsyD(*O*-MT): putative *O*-Methyltransferase.

Im ersten Modul von PsyD befindet sich eine putative *O*-Methyltransferasedomäne (*O*-MT). Ähnliche Domänen befinden sich im Cluster der Myxothiazol-Biosynthese.⁷¹ Aus der Position dieser Domäne im Gencluster kann abgeleitet werden, dass diese vermutlich an der Biosynthese der Methoxygruppe an der Amid-Seitenkette beteiligt ist (Abbildung 28).

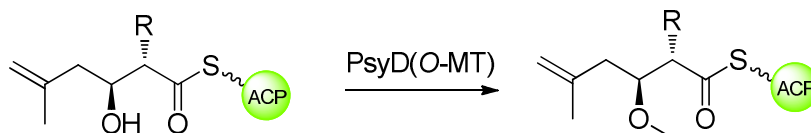


Abbildung 28: Postulierte Funktion des Proteins PsyD(*O*-MT); R: -H oder -OH.

In herkömmlichen Polyketiden werden Hydroxygruppen üblicherweise durch Reduktion der Ketofunktion über KR-Domänen eingeführt. Diese Hydroxygruppen befinden sich dann in β -Stellung des Thioesterintermediates. Bei Psmberin befindet sich jedoch an C5 und C7 eine Hydroxygruppe in α -Stellung, die von einzelnstehenden Enzymen, PsyC und PsyK, katalysiert werden zu scheint.⁶⁷ Dies wird bei PsyC aufgrund der Ähnlichkeit mit Phytanoyl-CoA Dioxygenasen vermutet. Diese gehören zu den Fe(II)- α -Ketoglutaratabhängigen α -Hydroxylasen. In Übereinstimmung damit wurde von Dr. Holger Niederkrüger Eisen im exprimierten Enzym nachgewiesen.⁷² Fe(II)- α -Ketoglutaratabhängige Enzyme katalysieren eine Vielzahl an Reaktionen, so haben sie unter anderem Bedeutung bei der Modifikation an Proteinseitenketten, der

Reparatur von alkylierter DNA und RNA und bei der Biosynthese von Antibiotika und Naturstoffen von Pflanzen.⁷³

PsyK wiederum weist eine große Homologie zu MtaG auf, einer Oxygenase, die an der Myxothiazol-Biosynthese mitwirkt. MtaG katalysiert die Hydroxylierung eines Glycinrestes, wodurch ein instabiles Halbaminal entsteht. Dieses wird durch Zerfall als Endprodukt der Biosynthese vom Enzymkomplex gelöst.⁷⁴ Es ist vermutlich eine Flavin-abhängige Oxygenase, ähnlich einer Luciferase-Oxygenase. Es ist nicht sicher, welches der beiden Enzyme für welche Hydroxylierung verantwortlich ist. Ein Hinweis gibt die Nosperin-Biosynthese, bei der zwar die Hydroxylierung neben der Methoxygruppe katalysiert wird, aber nicht die des Glycins.⁷⁵ Nosperin ist ein kürzlich entdecktes Polyketid der Pederinfamilie. Es wird von einem *Nostoc sp.* Cyanobacterium produziert, das mit Flechten assoziiert ist. Da der Cluster des Nosperins kein PsyC-Homolog enthält, ist es wahrscheinlich, dass PsyC die Glycin-Hydroxylase ist und PsyK die Hydroxylase für den Westarm (Abbildung 29). Ebenso ist nicht klar, ob die α -Hydroxylierung oder die Methoxylierung zuerst stattfinden.

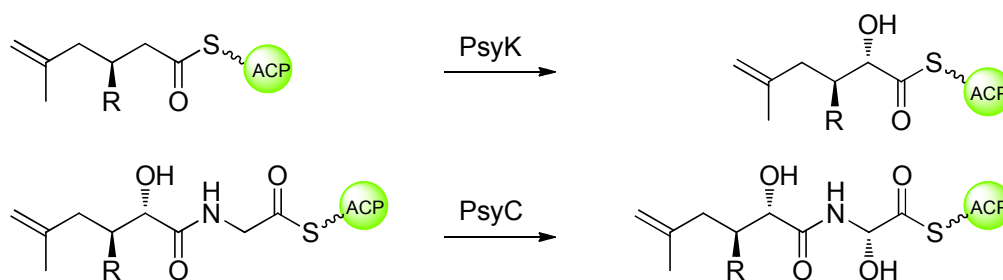


Abbildung 29: Putative Funktionen der Proteine PsyC und PsyK; R: -OH oder -OMe.

1.3.2 Pederin (28) und dessen Biosynthese

Pederin (**28**) wurde in Käfern der Gattungen *Paederus* und *Paederidus* gefunden⁷⁶ und ist eine hoch toxische Verbindung. Im biologischen Kontext der Käfer wird der Naturstoff **28** wahrscheinlich als chemische Waffe gegen Fraßfeinde, hauptsächlich gegen (Wolfs-) Spinnen eingesetzt.⁷⁷ **28** findet sich in höchster Konzentration in 85% der weiblichen Käfer. Von diesen wird er an die Eier weitergegeben und schützt die Eier somit.⁷⁷ Auch Pederin (**28**) besitzt starke antitumorale Eigenschaften. Es wirkt bereits in Konzentrationen von 1.5 ng/mL als Inhibitor der Protein- und DNA-Biosynthese und

induziert so in einigen Zelllinien Apoptose.⁷⁸ Es wurde gezeigt, dass es, wie Psymberin, von bakteriellen Symbionten produziert wird.⁷⁹

Der Pederin-Gencluster codiert für einen PKS-NRPS Hybrid, bei dem die AT-Domänen *in trans* agieren. Dieser besteht aus drei Enzymkomplexen. Funktionelle Studien an den entsprechenden Enzymen des Genclusters wurden bereits an *O*-Methyltransferasen (*O*-MTs) und ATs durchgeführt und lieferten gute Hinweise auf die Funktionalität des Genclusters.^{80,81} Weitere Biosyntheseschritte wurden über die Kolinearitätsregel für PKS-Systeme bzw. über die Kolinearitätsregel für *trans*-AT PKS Systeme hergeleitet. Am Ende der Biosynthese gibt es zwei mögliche Wege zum Endprodukt **28**: Eine Möglichkeit ist die Biosynthese bis zum letzten Modul von PedF und dortige oxidative Abspaltung vom Enzym zum Intermediat **31**. Alternativ dazu gibt es die Möglichkeit der kompletten Biosynthese über PedH, Abspaltung durch die TE zum Intermediat **30**, oxidativer Spaltung zu **31** und Methylierung zu Pederin (**28**) (Abbildung 30). Welcher Weg der korrekte ist, konnte aus den Daten nicht abgeleitet werden.

Auch in der Pederin-Biosynthese spielen ungewöhnliche Domänen und Enzyme eine Rolle. Ebenso wie in der Psymberin-Biosynthese erfolgt die Initiierung durch eine GCN5-verwandte *N*-Acetyltransferase-(GNAT) Domäne, und auch in der Pederin-Biosynthese gibt es *O*-Methyltransferasen. Mit PedK existiert auch eine postulierte α -Hydroxylase, ein Homolog zu PsyC.

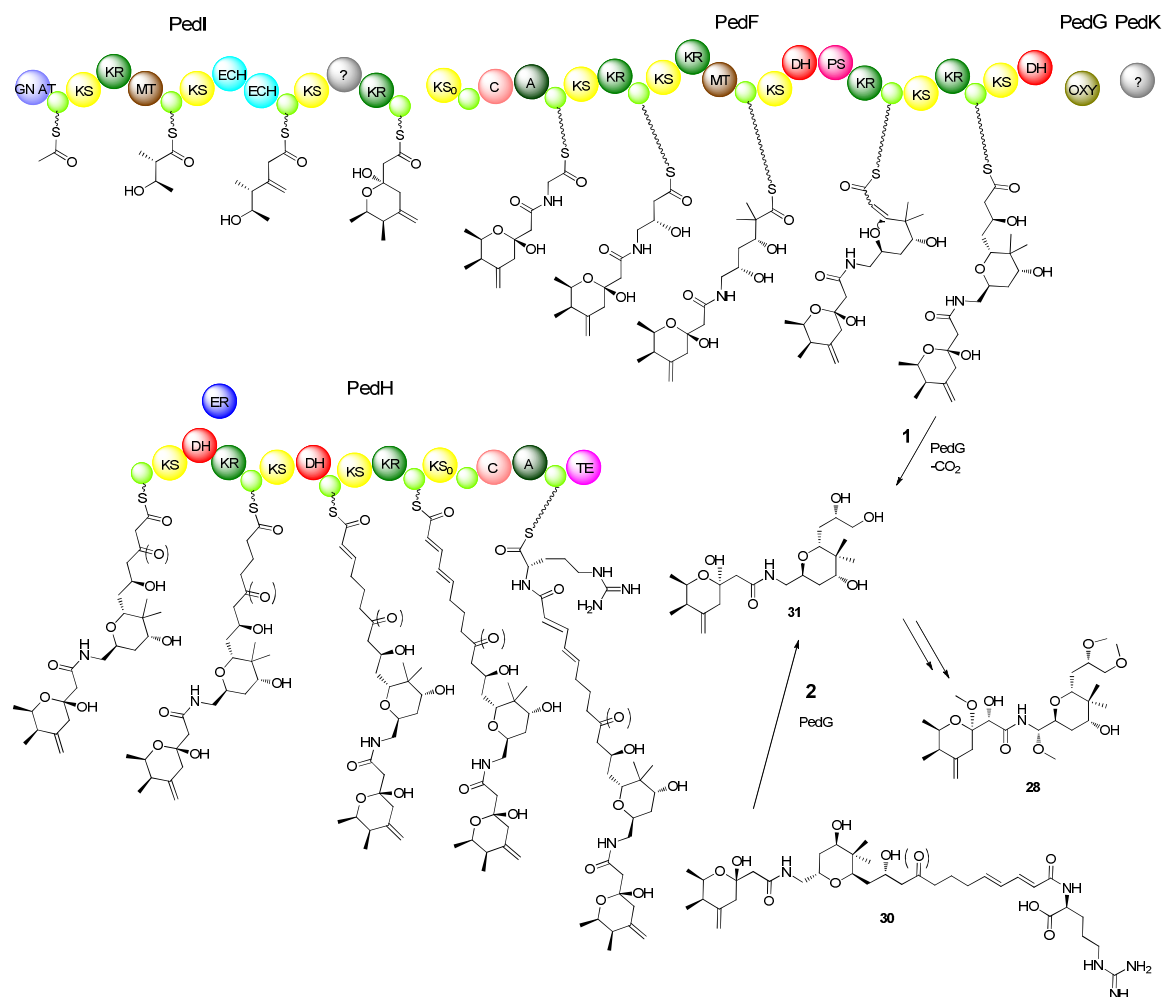


Abbildung 30: Putative Biosynthese von Pederin (28) durch einen PKS-NRPS-Hybrid. Zur Bildung des Endproduktes existieren zwei hypothetische Wege. 1: Biosynthese bis zum Intermediat von Modul PedF mit anschließender oxidativer Spaltung in einer Bayer-Villiger Oxidation durch PedG (FAD-abhängige Monooxygenase) zu 31. 2: Komplette Biosynthese über PedH zu 30 mit anschließender oxidativer Spaltung in einer Bayer-Villiger Oxidation durch PedG (FAD-abhängige Monooxygenase) zu 31 und dann Umwandlung in Pederin (28).

1.3.3 Hormaomycin (32) und dessen Biosynthese

Hormaomycin (32) wurde 1984 erstmals entdeckt und zuerst Takaokamycin benannt. Es wurde aus der Fermentationslösung des Bakteriums *Streptomyces* sp.AC-1978 isoliert, das wiederum aus einer Bodenprobe aus Toyama (Japan) isoliert wurde. Die Strukturaufklärung gelang allerdings nicht vollständig.⁸² Fünf Jahre später wurde in einer Erdprobe aus Anuradhapura (Sri Lanka) durch den Arbeitskreis um Hans Zähler in Göttingen die Substanz im Stamm *Streptomyces griseoflavus* W-384 wiederentdeckt und Hormaomycin genannt.⁸³ Die Strukturaufklärung gelang erst im Jahr 1990,⁸⁴ wohingegen die absolute Konfiguration erst 2004 ermittelt wurde.⁸⁵ Hormaomycin (32) ist ein cyclisches Lacton, das aus sechs Aminosäuren besteht. Im Ring gebunden sind zwei

Einheiten 3-(2*S*,3*R*)-Methylphenylalanin [(β -Me)Phe], ein (1'*R*,2'*R*)-(trans-2'-Nitrocyclopropyl)alanin [(3-Ncp)Ala]-Strukturelement, eine Einheit *L*-Isoleucin (Ile), und eine Einheit (*R*)-*allo*-Threonin (*a*-Thr), zwischen dem die Esterbindung zur Säuregruppe des (2*S*,4*R*)-4-(*Z*-Propenyl)prolins [(4-Pe)Pro] ausgebildet wird. Über die Aminogruppe des (*R*)-*allo*-Threonins ist das Grundgerüst mit einer Seitenkette, bestehend aus (1'*R*,2'*R*)-(trans-2'-Nitrocyclopropyl)alanin [(3-Ncp)Ala] und 5-Chlor-1-hydroxy-pyrrol-2-carbonsäure (Chpca) modifiziert (Abbildung 31).⁸⁵

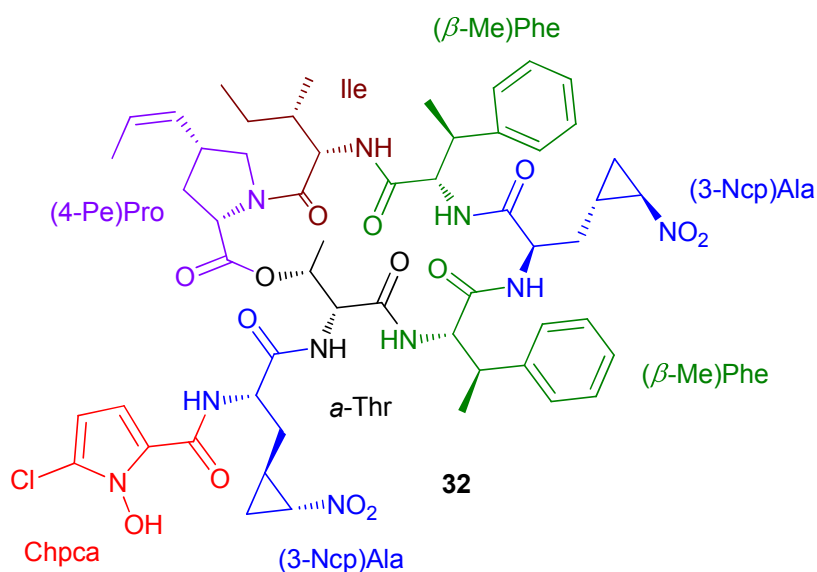


Abbildung 31: Struktur von Hormaomycin (32).

Hormaomycin (**32**) regt im nanomolaren Bereich die Bildung von Luftmycel und die Produktion von sekundären Metaboliten beim Produzentenstamm und in vielen anderen Stämmen an. Weiterhin wurde für **32** zudem eine starke antibiotische Wirkung auf coryneforme Actinomyceten und den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* beobachtet.^{83,86}

Die Bildung von Hormaomycin (**32**) wird durch eine NRPS katalysiert (Abbildung 32). Der Gencluster des Hormaomycin (**32**) umfasst 23 ORFs und ist 48 kB groß. Es gibt acht PCP-Domänen, die die wachsende Kette weiterreichen, was sich im Molekül in den acht unterschiedlichen Bausteinen widerspiegelt.⁸⁷ Interessante Enzyme stellen hierbei HrmI und HrmJ dar, deren Funktion noch nicht aufgeklärt wurde. Es wird jedoch vermutet, dass diese beiden Proteine für eine Umsetzung von Lysin zu 3-(trans-2'-Nitrocyclopropyl)alanin verantwortlich sind.⁸⁸

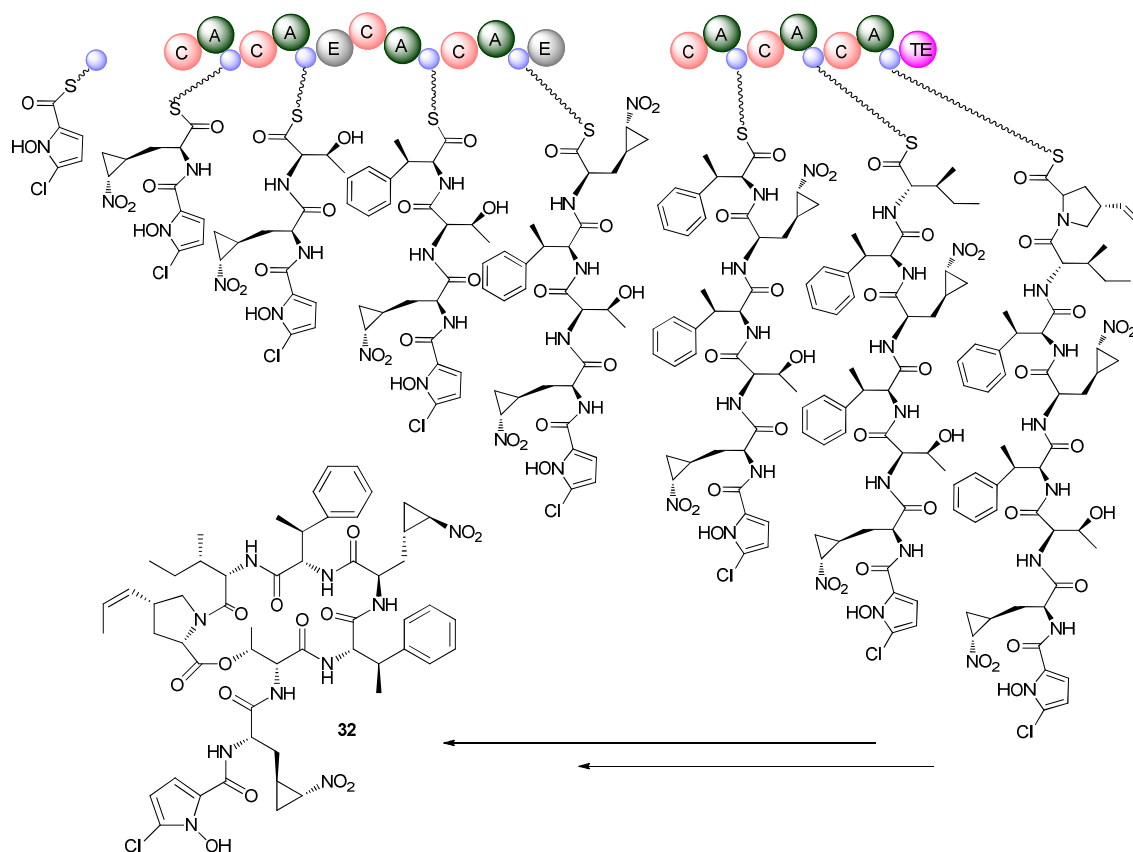


Abbildung 32: Hormaomycin (32)–Biosynthese durch eine NRPS; blaue Domänen: PCP-Domänen; rosa Domänen: Condensations-Domänen; grüne Domänen: Adenylierungsdomänen, pinke Domäne: Thioesterase.

1.3.4 Corallopyronin A (33) und dessen Biosynthese

Corallopyronin A (33) wurde erstmals 1985 aus dem Myxobakterienstamm *Coralloccoccus coralloides* c127 von der Arbeitsgruppe um Irschik *et al.* isoliert.⁸⁹ Es besitzt eine große antibiotische Aktivität gegenüber Gram-positiven Bakterien. Es ist in der Lage bakterielle DNA-abhängige RNA (RNAP) zu inhibieren.⁹⁰

Corallopyronin A (33) stellt, zusammen mit Myxopyronin A, einen neuen Strukturtyp von Antibiotika dar und besitzt einen Pyronring mit zwei Seitenketten. Eine Seitenkette besitzt eine terminale Vinylcarbamatsfunktion, die andere mehrere Doppelbindungen und eine Hydroxyfunktion (Abbildung 33).^{91,92}

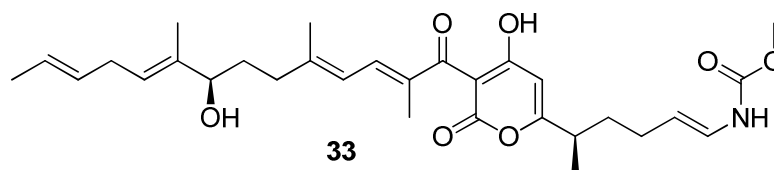
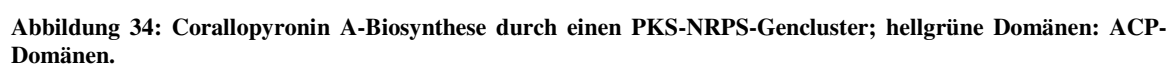


Abbildung 33: Struktur von Corallopyronin A (33).



1.3.5 Bacillaen (34) und dessen Biosynthese

Aufgrund der Instabilität von Bacillaen (**34**) wurde die Struktur erstmals im Jahr 2007 aus teilweise aufgereinigten Kulturextrakten von *B. subtilis* aufgeklärt, obwohl die Substanz lange bekannt ist.⁹⁴ Das Grundgerüst ist ein lineares Molekül mit zwei Amidbindungen: Die erste verbindet eine α -Hydroxycarbonsäure an ein Hexaen, die andere verbindet diese Einheit wiederum mit einem Trien, an dessen Ende eine Säuregruppe gebunden ist (Abbildung 35).

Somit ist Bacillaen (**34**) ein mehrfach ungesättigtes Polyketid, in das zwei Aminosäuren (Glycin und Alanin) eingebaut sind. Bacillaen (**34**) wird vom *pksX*-Gencluster kodiert, der in Bakterien der Art *Bacillus subtilis* vorkommt..⁹⁴ Kürzlich wurde ein weitgehend identischer Gencluster in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42 gefunden, der ebenfalls Bacillaen (**34**) produziert.⁵¹

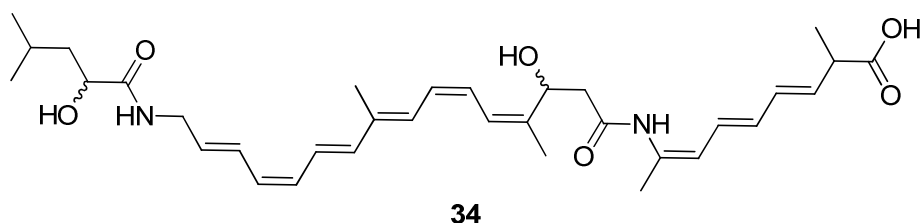


Abbildung 35: Struktur von Bacillaen (34).

Der Gencluster, der für die Biosynthese von Bacillaen (**34**) codiert, ist schon seit den 90ern bekannt.⁹⁵ Da jedoch erst kein metabolisches Produkt gefunden werden konnte und der Cluster eine ungewöhnliche Architektur besass, wurde er zunächst für ein inaktives evolutionäres Relikt gehalten.³¹ Erst 2006 konnte dieser PKS Bacillaen (**34**) zugeordnet werden.⁵¹ Die PKS von Bacillaen (**34**) ist ein *trans*-AT PKS-NRPS Hybrid (Abbildung 36).⁹⁶

Bacillaens (**34**) beschritten.⁹⁷ Ebenso ist es möglich, durch die Fütterung von Isotopen-markierten Bausteinen, wie z.B. ¹³C-markierten Acetat, Erkenntnisse über Biosynthesewege zu erlangen.⁹⁸ Auch die Fütterung nicht-markierter Derivate von Intermediaten kann zur Aufklärung beitragen. Hier wurde bereits mehrfach erfolgreich gezeigt, dass diese von Bakterien akzeptiert und weiter prozessiert werden.^{99,100,101,102}

Bei Bakterien, für die es bisher keine geeigneten Bedingungen zur Kultivierung gibt, erfolgt die Charakterisierung einzelner Domänen und Enzyme über *in vitro*-Experimente. Diese werden mit heterolog exprimierten Proteinen oder Proteindomänen an Substraten durchgeführt. Hierbei werden die Gensequenzen der Enzyme von Interesse in Expressionsvektoren kloniert und die Proteine exprimiert. Die somit erhaltenen Proteine werden aufgereinigt und in Assays mit vorher synthetisierten Substraten umgesetzt. Die Art des Substrates hängt hierbei von der aus dem Gencluster postulierten Funktion des Enzyms ab. In Typ I und Typ II-PKS sind die Intermediate über einen 4'-Phosphopantethein-Linker (PPant) an ein aktiviertes Acylcarrierprotein (ACP) gebunden.⁷ Es hat sich gezeigt, dass anstelle von ACP-gebundenen Substraten oft auch CoA (**8**)-Intermediate oder *N*-Acetylcysteaminthioester (SNAC-Ester, **35**) akzeptiert werden (Abbildung 37).¹⁰³

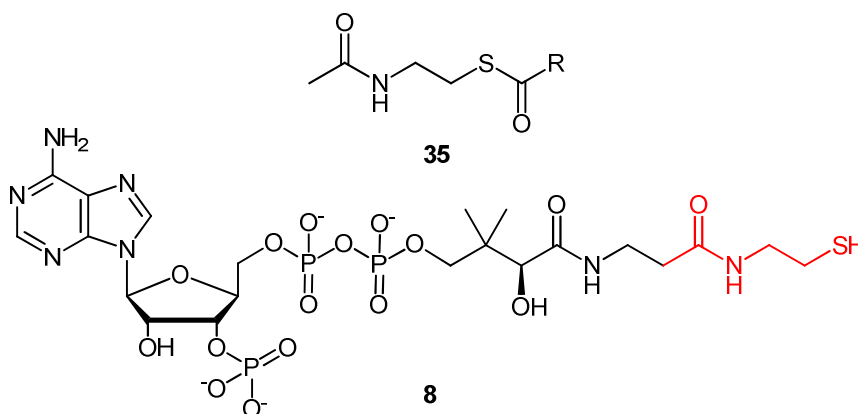


Abbildung 37: SNAC-Thioester (**35**) und CoA (**8**).

SNAC-Ester besitzen viele Vorteile gegenüber CoA-Intermediaten: Zum einen sind SNAC-Ester (**35**) im Vergleich zu CoA-Thioestern durch das günstigere *N*-Acetylcysteamine günstiger zu synthetisieren, zum anderen sind sie leichter zu synthetisieren und einfacher zu handhaben.

2. Zielsetzung

Um die Substratspezifität in *trans*-AT-Ketosynthasedomänen zu untersuchen, sollten sieben verschiedene Thioester synthetisiert werden. Diese sollten mit den ersten drei KS aus der Psymberin-PKS getestet werden. Falls eine derartige Spezifität besteht, könnte es möglich sein, neue *trans*-AT-Cluster zukünftig über einen einfachen Assay zu charakterisieren.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit war die Untersuchung von neuartigen Biosyntheseschritten der Psymberin-PKS. Um die Funktion der putativen *O*-Methyltransferase PsyD(*O*-MT) und der zwei α -Hydroxylasen PsyC und PsyK zu beweisen und somit einen ersten Beweis für die Psymberin-PKS zu erbringen, sollten ebenfalls zwei verschiedene Thioester synthetisiert und in *in vitro*-Assays mit den zugehörigen Enzymen umgesetzt werden.

Für weitere Studien an der NRPS von Hormaomycin sowie am PKS-NRPS-Hybrid von Corallopyronin sollten zwei verschiedene Testsubstrate synthetisiert werden.

2.1 Untersuchungen der Substratspezifität von *trans*-AT-KS-Domänen

Polyketide finden sich in vielen klinisch relevanten Stoffen, so unter anderem im Antibiotikum Erythromycin A (**1**), im Immunsuppressivum Rapamycin (**5**), oder in dem zytostatisch wirkenden Epothilon (**3**). Unter den Typ I-PKS wurden vor kurzem die *trans*-AT-PKS entdeckt.³¹ *Trans*-AT-PKS sind eine neuartige Gruppe von PKS, bei denen die AT-Domänen nicht im Gencluster lokalisiert sind, sondern in *trans* agieren.^{30,26} Diese PKS besitzen Module komplexer Struktur mit Domänen vieler unterschiedlichster Funktionen. Die Funktionsweisen dieser Domänen sind bislang noch nicht richtig verstanden, so dass auf diesem Gebiet noch viel Forschung betrieben werden muss. Studien deuten darauf hin, dass in Bakterien *trans*-AT-PKS häufig durch Rekombination von Genbereichen entstehen.¹⁰⁴ Dies legt die Vermutung nahe, dass bei der Nachahmung im Labor eine größere Chance besteht ein neuartiges Polyketidgerüst zu erhalten als bislang bei *cis*-AT-PKS. Auch ergaben phylogenetische Untersuchungen, dass die Gensequenz einer KS-Domäne mit dem putativ akzeptierten Substrat korreliert. Das erlaubt eine Voraussage der Polyketidstrukturen, ähnlich dem des Colinearitätsprinzips

bei *cis*-AT-PKS. Allerdings beruht diese Hypothese einer KS-Spezifität bisher nur auf *in silico* Daten.

Eines der Ziele der vorliegenden Promotionsarbeit war es, mehr über die Spezifität von KS-Domänen in *in vitro* Untersuchungen herauszufinden. Hierdurch sollten neue Einsichten in modulare Komponenten von *trans*-AT-PKS gewonnen werden. Falls eine Ketosynthespezifität besteht, könnte es möglich sein, neue *trans*-AT-Cluster über einen einfachen Assay zu charakterisieren.

Um diese Spezifität zu testen, sollten sowohl die ersten drei KS-Domänen im Psymberin-Gencluster (KS1, KS2 sowie KS3) als auch die fünfte KS aus dem Bacillaen-Gencluster (KS5) mit SNAC-Testsubstraten in Enzym-Assays umgesetzt werden. So sollte getestet werden, ob es eine generelle Substratspezifität von KS-Domänen gibt und wie groß diese ist. Die Psymberin-KS-Domänen wurden ausgewählt da sie verschiedene Besonderheiten aufweisen: So findet die Initiierung der Biosynthese nicht, wie bei *cis*-AT-Systemen, durch eine AT statt, sondern durch eine GCN5-verwandte *N*-Acetyltransferase- (GNAT) Domäne. Als weitere Besonderheit ist die KS3 im Psymberin-Gencluster eine nicht-elongative KS (Abbildung 38).

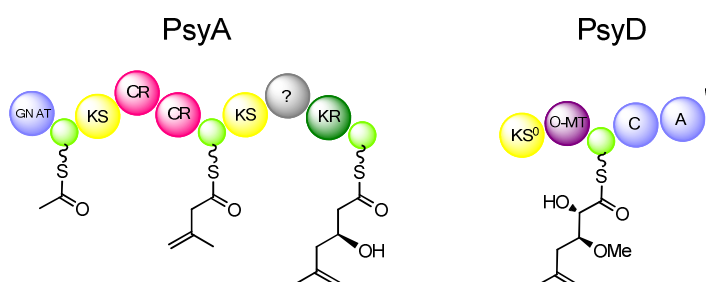


Abbildung 38: Ausschnitt aus der PKS von Psymberin (27), in der die ersten drei KS lokalisiert sind, und postulierte Biosynthese.

Für einen allgemeinen Test verschiedenster Substrate sollten zunächst die Thioester **36**–**42** synthetisiert werden (Abbildung 39). Die Thioester *S*-**37** und *R*-**37** sollten im Rahmen der Promotion von Dr. Christoph Kohlhaas synthetisiert werden.

In weiteren Studien sollte die Beladung der KS1 des Psymberin-Genclusters mittels Acyl-ACPs untersucht werden. Hierfür sollte ebenfalls der Thioester **43** synthetisiert werden.

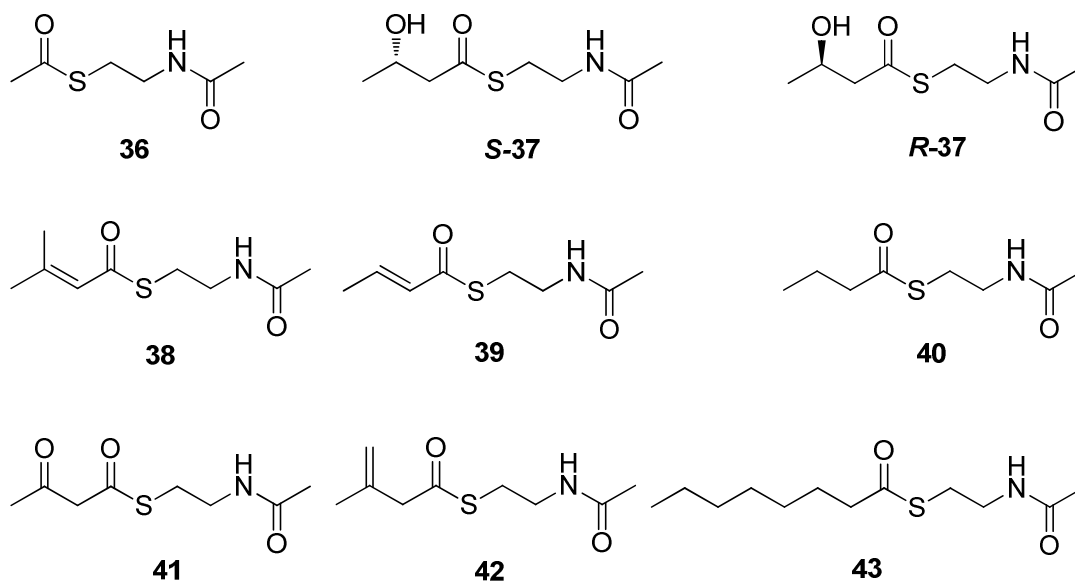


Abbildung 39: Darzustellende SNAC-Thioester 36-42 für die KS-Assays sowie Thioester 43 für den ACP-Assay.

2.2 Untersuchungen der putativen *O*-Methyltransferase PsyD(*O*-MT) und der putativen α -Hydroxylasen PsyC und PsyK aus der Psymberin-PKS

In der Psymberin-PKS existieren einige ungewöhnliche Proteine, deren Funktion allerdings noch nicht bestätigt wurde. (Abbildung 40).

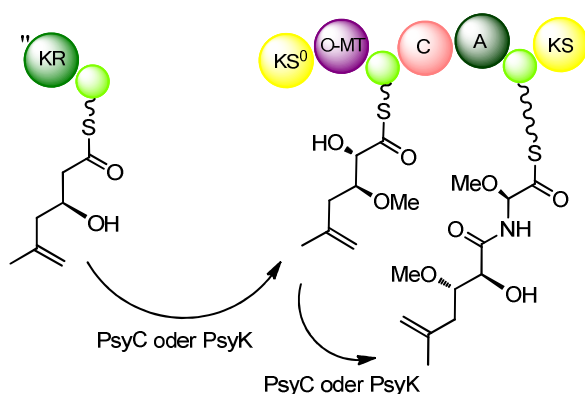


Abbildung 40: Ungewöhnliche Proteine im Psymberin-Gencluster; *O*-MT: *O*-Methyltransferase (PsyD); PsyC/PsyK: α -Hydroxylasen.

Im ersten Modul von PsyD befindet sich eine putative *O*-Methyltransferasedomäne (*O*-MT). Anhand der Position dieser Domäne im Gencluster kann abgeleitet werden, dass diese vermutlich an der Biosynthese der Methoxygruppe an der Amid-Seitenkette

beteiligt ist (Abbildung 41). Ähnliche Domänen wurden im Cluster der Myxothiazol-Biosynthese in den Modulen MtaE und MtaF gefunden.⁷¹

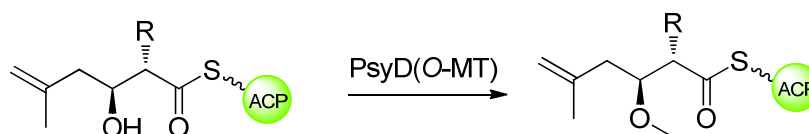


Abbildung 41: Putative Funktion der *O*-Methyltransferase von PsyD; R: -H oder -OH.

Eine weitere Besonderheit stellen die putativen α -Hydroxylasen PsyC und PsyK dar. Hydroxygruppen werden üblicherweise durch Reduktion der Ketofunktion in β -Position zur Thioesterfunktion mittels KR-Domänen eingeführt. Psymberin (**27**) ist jedoch an C5-Position und C7-Position α -hydroxyliert. Diese Hydroxygruppen werden vermutlich von PsyC und PsyK eingeführt.⁶⁷

PsyC ist den Phytanoyl-CoA Dioxygenasen ähnlich, die zu den Fe(II)- α -Ketoglutaratabhängigen α -Hydroxylasen gehören. In Übereinstimmung damit wurde von Dr. Holger Niederkrüger Eisen in PsyC nachgewiesen.⁷² PsyK wiederum weist eine Homologie zu MtaG auf, einer Oxygenase, die an der Myxothiazol-Biosynthese mitwirkt.⁷⁴ Es ist vermutlich eine Flavin-abhängige Oxygenase, ähnlich einer Luciferase-Oxygenase.

Bislang wurde die Funktion jedoch nicht biochemisch getestet und nicht gezeigt, welches der beiden Enzyme für welche Reaktion verantwortlich ist. Dies soll im Laufe der Dissertation mittels Enzym-Assays aufgeklärt werden. Ein Hinweis gibt die Nosperin-Biosynthese, bei der zwar eine analoge Hydroxylierung an C-5, aber keine am Glycin stattfindet.⁷⁵ Da der Cluster kein PsyC-Homolog enthält, ist es wahrscheinlich, dass PsyC die Glycin-Hydroxylase ist und PsyK die Hydroxylase für den Westarm (Abbildung 42). Ebenso ist nicht erwiesen, ob die α -Hydroxylierung oder die Methoxylierung zuerst stattfinden. Auch dies soll mittels Enzymassays aufgeklärt werden.

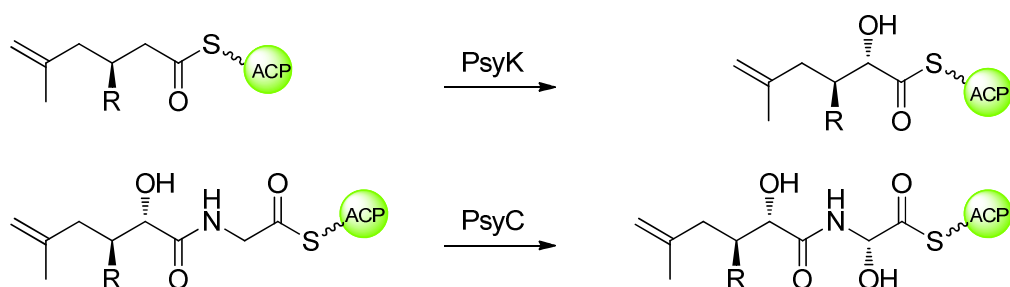


Abbildung 42: Putative Funktionen der Enzyme PsyK und PsyC.; R: -OH oder -OMe.

Die Proteine PsyD(*O*-MT), PsyC, sowie PsyK lagen von Dr. Holger Niederkrüger im Expressionsvektor pHis8 kloniert vor.⁷²

Aufgabe der vorliegenden Promotion war es, die Testsubstrate **44b**, und **45a,b** für diese Enzyme zu synthetisieren und in Enzym-Assays umzusetzen (Abbildung 43). Der Thioester **44a** wurde bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit synthetisiert.¹⁰⁵

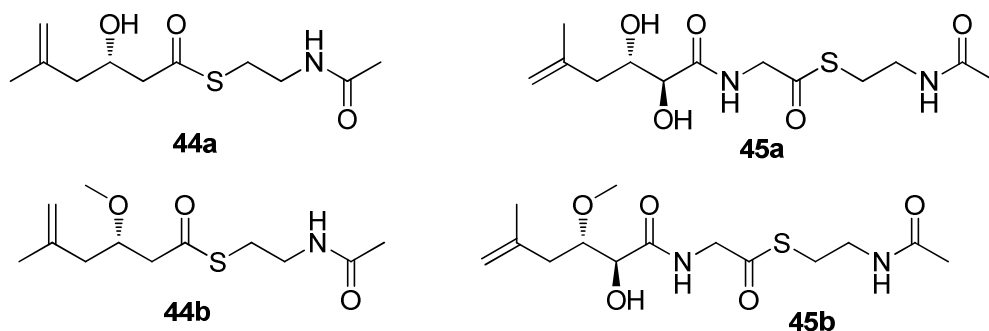


Abbildung 43: Testsubstrate 44b, 45a/45b, sowie im Rahmen vorangegangener Arbeiten bereits synthetisiertes Testsubstrat 44a für die Umsetzung mit PsyC/PsyK und PsyD(*O*-MT).

2.3 Synthese der Testsubstrate für Untersuchungen an der Pederin PS-Domäne

Psymberin (**27**), Pederin (**28**) und Misakinolid (**33**) besitzen PS-Domänen, die putativ für einen Ringschluss innerhalb der wachsenden Kette verantwortlich sind. Um diese Funktion zu verifizieren, sollten PS-Assays mit der PS-Domäne von Pederin (**28**) durchgeführt werden (Abbildung 44).

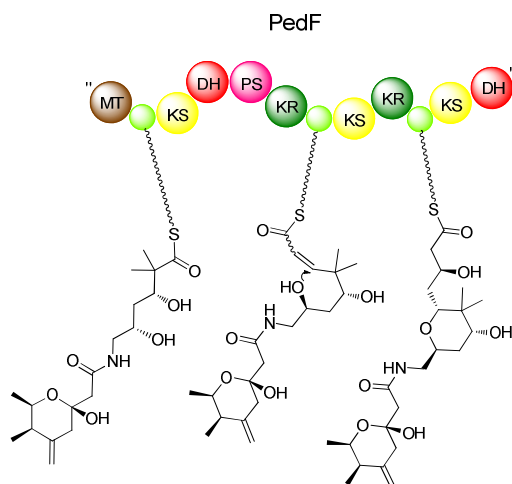


Abbildung 44: Modul in der Pederin-Biosynthese, in der die PS-Domäne (pink), die den Ringschluß katalysiert, lokalisiert ist.

Die PS-Domänen-Assays wurden im Rahmen der Promotion von Petra Pöplau durchgeführt, im Rahmen dieser Arbeit sollten das Testsubstrat **46** und der Teststandard **47** synthetisiert werden (Abbildung 45).

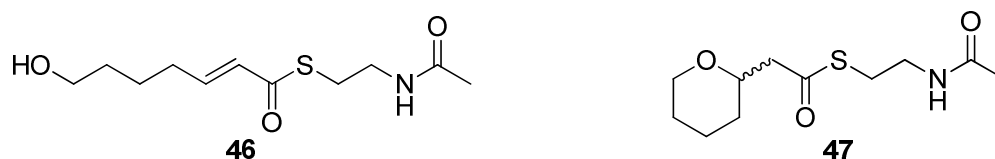


Abbildung 45: Zu synthetisierende Testsubstrate 46 und 47 für den PS-Assay.

Der Thioester **46** sollte im Assay eingesetzt werden, das Tetrahydropyransubstrat **47** sollte als Standard für die HPLC- (High-performance liquid chromatography) Analyse des Assays dienen.

2.4 Synthese eines Intermediates für Untersuchungen von HrmI und HrmJ aus der Hormaomycin-NRPS

In Hormaomycin (**32**) ist mit 3-(*trans*-2'-Nitrocyclopropyl)alanin [(3-Ncp)Ala] (**48**) eine Aminosäure mit außergewöhnlichen Strukturmerkmalen eingebaut (Abbildung 46). Diese wird vermutlich von den Proteinen HrmI und HrmJ aus dem Hormaomycin-Gencluster (siehe Abschnitt 1.4) generiert.⁸⁸

L-Lysin (**49**) wird vermutlich zunächst von HrmJ an C4 zum Intermediat **50** hydroxyliert, das daraufhin spontan zum Lacton **51** cyclisiert. Nach Oxidation der Aminofunktion in **51** zur Nitrosoverbindung **52** bildet sich das Oxim **53** durch Tautomerisierung. Die putativ letzten Schritte, vermutlich durch HrmI katalysiert, sind die Cyclopropanbildung zu (3-Ncp)Ala **48** durch nukleophilen intramolekularen Angriff der Oximdoppelbindung, gefolgt von der Oxidation der Nitrosogruppe in **52** zur Nitrofunktion in **54** (Abbildung 46).

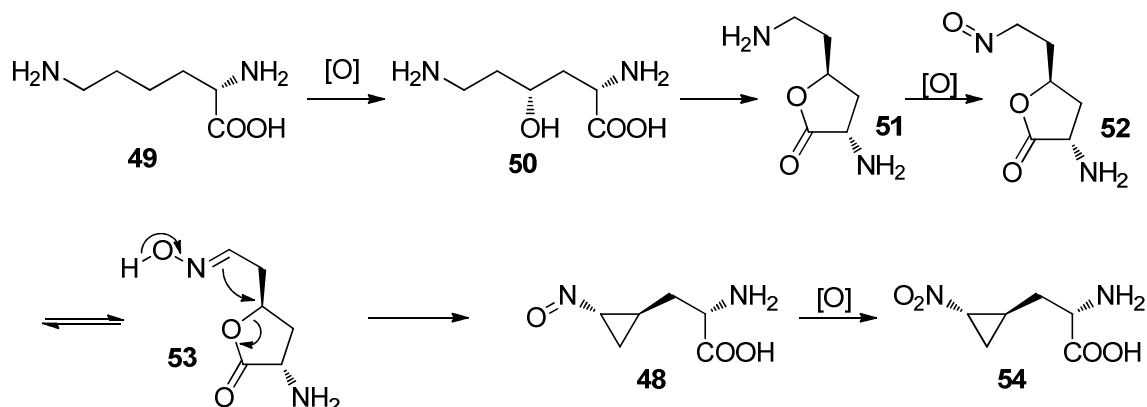


Abbildung 46: Putativer Biosyntheseweg von (3-Ncp)Ala (**48**).¹⁰⁶

Um die Funktionen von HrmI und HrmJ zu testen, sollte das Oxim **53** dargestellt werden. Dieses sollte als Teststandard für HrmJ und als Testsubstrat für HrmI in *in vitro* Assays eingesetzt werden.

2.5 Synthese eines Intermediats für Untersuchungen von CorB aus der Corallopyronin A-PKS/NRPS

Corallopyronin A (**33**) ist eine Substanz aus Myxobakterien und besitzt eine hohe antibiotische Wirkung. Die Biosynthese von Corallopyronin A ist interessant, da zuerst zwei Ketten gebildet werden, die dann durch CorB, einer Ketosynthase, zu einem Pyronring verknüpft werden.⁹² Für Untersuchungen an CorB sollte Substanz **55** synthetisiert werden (Abbildung 47). Sie besitzt aufgrund ihrer Kettenlänge und der Carbonylfunktion in β -Position vereinfachte Ähnlichkeit mit dem Substrat, das in der Biosynthese genutzt wird.⁹²

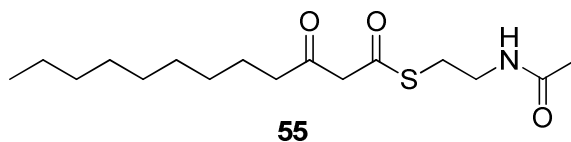


Abbildung 47: Intermediat 55 zur Co-Kristallisierung mit CorB.

Sie sollte zur co-Kristallisation verwendet und in *in vitro*-Assays mit CorB von Dr. Till Schäberle umgesetzt werden, hierbei sollte ein Ringschluß zwischen zwei Molekülen des Testsubstrats **55** zum Lacton **56** untersucht werden (Abbildung 48).

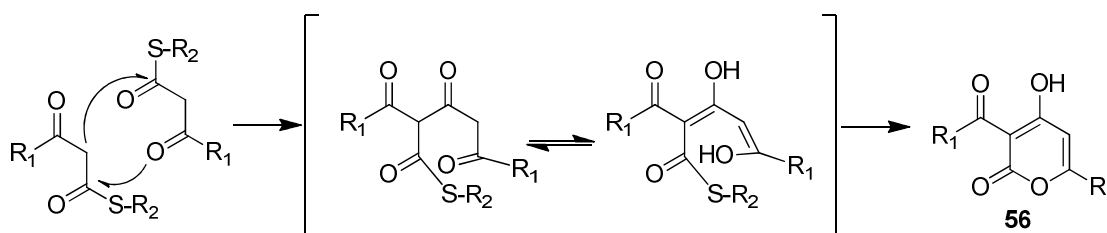


Abbildung 48: Bildung des Pyronringschlusses zu 56; $R_1: C_8H_{18}$, $R_2: C_4H_8NO$.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Studien zur Substratspezifität in *trans*-AT PKS

Standard-Typ I-PKS agieren nach dem „Fließband-Prinzip“, das eine Voraussage der jeweiligen Struktur anhand der genetischen Sequenz in den meisten Fällen möglich macht (siehe Abschnitt 1.1.3). Bei *trans*-AT-PKS, bei denen die AT-Domänen nicht in die Module integriert sind, ist dies nach den dort verwendeten Vorhersagemethoden in den meisten Fällen nicht möglich.²⁶ Hier werden Module teilweise mehrfach durchlaufen, sind inaktiv oder die Domänenabfolge stimmt nicht mit der Polyketidstruktur überein. Durch phylogenetische und biosynthetische Studien wurde jedoch ein Regelwerk entwickelt, mit dem eine Vorhersage des Polyketids anhand der Modulanordnung möglich ist. Dieses Regelwerk basiert auf einer Verwandtschaftsanalyse der KS, anhand der die Substrate der KS vorausgesagt werden kann.¹⁰⁴ Dadurch ergibt sich eine gute Möglichkeit für eine Produktvoraussage in *trans*-AT-PKS Systemen. Dieses Regelwerk dient bereits *in silico* als Grundlage für ein *trans*-AT-Korrelationsprinzip, um jedoch weitere Erkenntnisse hierüber zu erlangen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Substratspezifitäten verschiedener KS-Domänen aus *trans*-AT-PKS *in vitro* untersucht. Bei diesen Untersuchungen werden unter anderem weitere wichtige Erkenntnisse zum Potential der kombinatorischen Biosynthesen in *trans*-AT-PKS erhofft. Als bereits bekannte Systeme für diese Untersuchungen wurden die Gencluster des antibiotisch aktiven Polyketids Bacillaen (**34**) sowie des antitumoralen Polyketids Psymberin (**27**) verwendet.

3.1.1 Methode

Die verwendete Methode wurde in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Oldham in Nottingham (VK) entwickelt. Die Technik der Elektrosprayionisation (ESI) ist ein nützliches Werkzeug für Studien an Proteinen und Proteinkomplexen. Die Kombination aus Massenspektrometrie mit schonenden Ionisationsmethoden wie ESI, erlaubt es, größere und labilere Proteinkomplexe zu analysieren. ESI hat die Eigenschaft, Biomoleküle in Lösung in die Gasphase zu bringen, ohne überschüssige Energie an die

Moleküle abzugeben. Aus diesem Grund ist es den Proteinen möglich, ihre Struktur während der Ionisation zu erhalten.

Nach Klonierung des entsprechenden Genabschnitts der KS in den pHis8-Vektor¹⁰⁷ (siehe Abschnitt 3.1.3) wird das Protein überproduziert, mit unterschiedlichen Testsubstraten (Abbildung 49) inkubiert und anschließend vermessen. Der *N*-Acetylcysteaminrest der verwendeten Derivate imitiert die ACPs, die normalerweise die Acylbausteine während der Biosynthese aktivieren.¹⁰² Die Ketosynthase erkennt bei passendem Acylrest das Intermediat und bindet dieses kovalent über die Thiofunktion. In dieser Arbeit soll nun untersucht werden, ob das Protein nur ausgewählte Substrate mit bestimmten Resten erkennt und bindet. Die Beladung des Proteins wurde zu verschiedenen Zeitpunkten beobachtet. Hierzu wurden die Assays mit Säure gestoppt und mittels ESI massenspektrometrisch untersucht. Aus den relativen Signalstärken des acylierten und nicht acylierten Proteins wurde der Quotient gebildet. Dadurch wurden die Acylierungsraten der unterschiedlichen Testsubstrate ermittelt und gegeneinander aufgetragen. Um ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten, wurde eine ganze Reihe an Testsubstraten **36-43** (Abbildung 49) synthetisiert und mit unterschiedlichen KS inkubiert. Hierbei wurden die Proteinkonstrukte im Arbeitskreis von Prof. Piel von Dr. Annette Kampa und mir kloniert und exprimiert und die Substrate synthetisiert. Anschließend wurde von Matthew Jenner aus der Arbeitsgruppe von Prof. Oldham der Assay durchgeführt und vermessen.

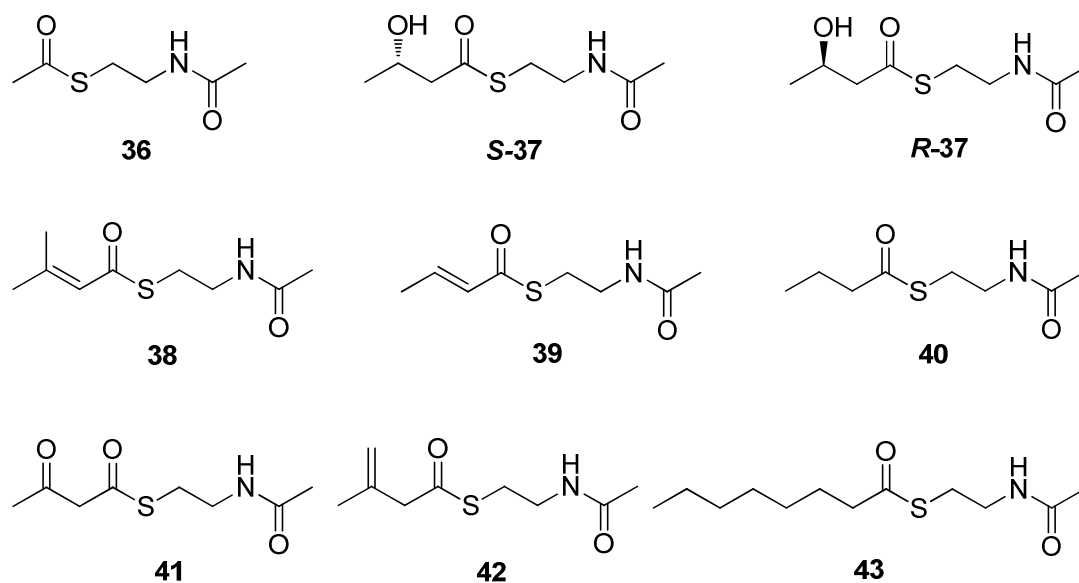


Abbildung 49: Für den KS-Assay dargestellte SNAC-Thioester 36–43.

3.1.2 Synthese der Thioester 36-42

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, Testsubstrate für die exprimierten Proteine KS1, KS2 und KS3 des Psymberingenclusters, sowie für KS5 des Bacillaen-Genclusters zu synthetisieren, die anschließend in Ketosynthase-Aktivitätstests umgesetzt wurden. Hierfür wurden acht verschiedene Thioester synthetisiert (Abbildung 49).

Die Mehrheit der Thioester wurde durch eine einfache Kupplungsreaktion mit *N*-Acetylcysteamin (**57**) dargestellt (Abbildung 50).

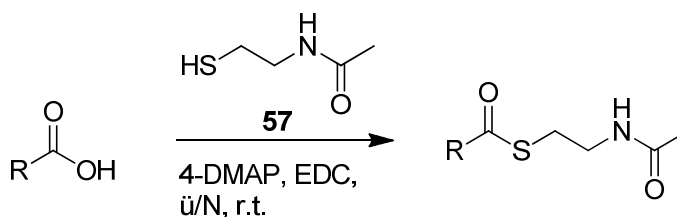
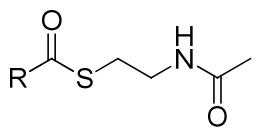
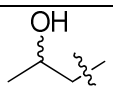
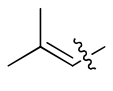
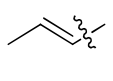
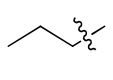
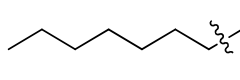


Abbildung 50: Allgemeine Synthese der Thioester 36–43.

Auf diesem Weg wurden *S*-Acetyl-*N*-acetylcysteamin (**36**), *S*-(3-Methylcrotonyl)-*N*-acetylcysteamin (**38**), *S*-Crotonoyl-*N*-acetylcysteamin (**39**), *S*-*n*-Butanoyl-*N*-acetylcysteamin (**40**), sowie *S*-Octanoyl-*N*-acetylcysteamin (**43**) in moderaten bis guten Ausbeuten dargestellt (Tabelle 1). Die besten Ausbeuten mit bis zu 90% für *S*-*n*-Butanoyl-*N*-Acetylcysteamin (**40**) erzielten hierbei die aliphatischen Säuren. Das Gemisch aus den Diastereomeren des β -Hydroxythioesters **37** wurde ebenfalls auf diese Art gewonnen, dieses wurde zwar in Assays verwendet, stellte in diesem Fall als Enantiomerengemisch jedoch nur ein Zwischenprodukt auf dem Weg zum β -Oxothioester (**41**) dar.

Der einfachste Thioester **36** wurde zum ersten Mal bereits 1951 synthetisiert und publiziert.¹⁰⁸ **36** wurde mit Hilfe von Keten und Aziridin erhalten. In der vorliegenden Arbeit wurde das Testsubstrat **36** erstmals über den einfacher zugänglichen Weg mittels Peptidkopplungsreagenzien synthetisiert. Der Thioester **43** ist ebenfalls literaturbekannt und wurde nach Vorschrift der Literatur synthetisiert.¹⁰⁹

Tabelle 1: Ausbeuten der Thioester 36-40 und 43, die über die Kupplungsreaktion mit EDC erhalten wurden.

 R =	Ausbeute
-CH ₃ (36)	70%
 (37)	63%
 (38)	40%
 (39)	54%
 (40)	90%
 (43)	82%

Für die Darstellung der Thioester **41** sowie **42** mussten zunächst die korrespondierenden Carbonsäuren synthetisiert werden. Im Fall der 3-Methyl-3-butenensäure **59** gelang das nach Nakahata *et al.*¹¹⁰ über eine Jones-Oxidation des 3-Methyl-3-buten-1-ols (**58**). Durch eine anschließende Kupplungsreaktion mit *N*-Acetylcysteamin (**57**) wurde der Thioester **42** synthetisiert (Abbildung 51). Die Ausbeuten der Kupplung lagen im Bereich von 2%, da sich der Thioester sowohl während der basischen Kupplungsreaktion als auch während der säulenchromatographischen Aufreinigung zum stabileren internen Intermediat **39** umlagerte.

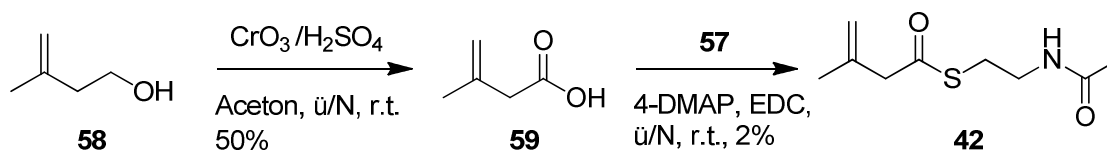


Abbildung 51: Darstellung von *S*-(3-Methyl-3-buten)-*N*-acetylcysteamin **42**.

Für den Thioester **41** wurde zunächst versucht, die entsprechende Säure **61** über eine Entschützung des Ethylesters **60** herzustellen und diese anschließend durch die Kupplungsreaktion mit *N*-Acetylcysteamin in den Thioester **41** umzuwandeln (Abbildung 52). Die Entschützung des Ethylesters **60** wurde wie in der Literatur von Krueger beschrieben¹¹¹ mit einer Ausbeute von 14% erzielt, eine Thioesterkupplung mit der Säure **61** wurde allerdings nicht erreicht. β -Ketosäuren sind instabile Verbindungen. Vermutlich tritt während der Reaktionsführung eine Decarboxylierungsreaktion der Säure **61** auf.

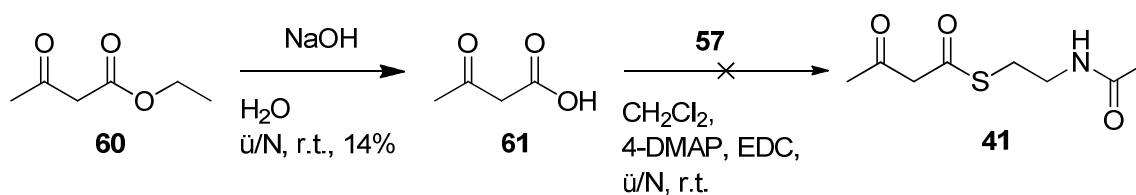


Abbildung 52: Darstellung der 3-Oxobutansäure **41**.

Der zweite Ansatz zum gewünschten Thioester **41** erfolgte über eine Oxidation des Alkohols **37**. Dieser wurde zunächst aus der β -Hydroxysäure **62** unter bereits bekannten Reaktionsbedingungen synthetisiert (Abbildung 53).¹¹² Dann wurde eine Oxidation der sekundären Alkoholfunktion über eine Dess-Martin-Periodinan-Oxidation versucht. Leider war diese nicht erfolgreich. Es wurde nur das Substrat **37** reisoliert.

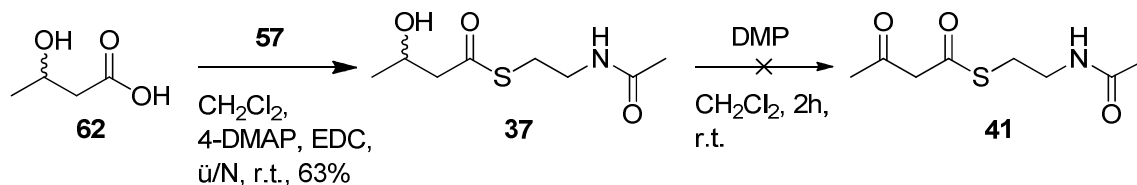


Abbildung 53: Darstellung von (S)-(3-Hydroxybutyl)-N-acetylcysteamin **41** und versuchte Oxidation.

Erhalten wurde der Thioester **41** schließlich über eine Ringöffnung des Lactons **63** durch *N*-Acetylcysteamin (**57**) nach Gilbert *et al.* (Abbildung 54).¹¹³

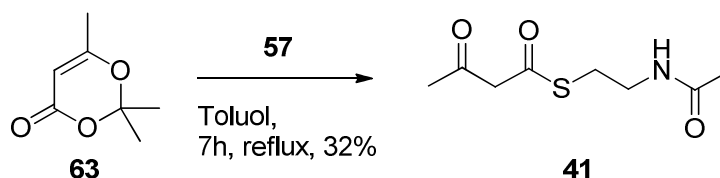


Abbildung 54: Darstellung des β -Ketothioesters 41.

3.1.3 Expression der KS-Domänen aus dem Psymberin-Gencluster

Zur Durchführung der Protein-Assays wurden die ersten drei Ketosynthasedomänen aus der Psymberin-PKS überexprimiert (Abbildung 55). Hierfür sollten die für die Ketosynthasedomänen KS1, KS2 und KS3 kodierenden Sequenzen des Psymberin-Genclusters über PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pHis8 kloniert werden um das gewünschte Protein überzuproduzieren. Die erhaltenen Proteine sollten in KS-Assays mit den synthetisierten Testsubstraten umgesetzt werden um eine eventuell vorhandene KS-Spezifität zu ermitteln.

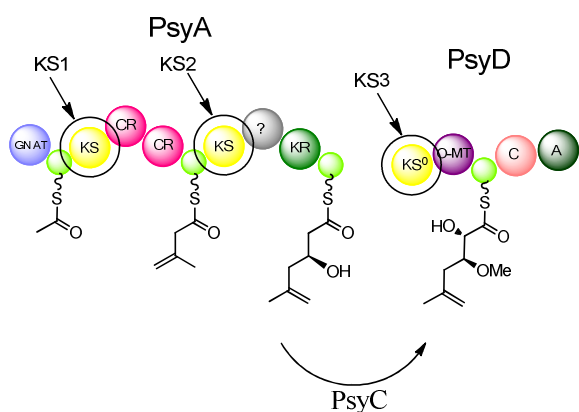


Abbildung 55: Ausschnitt des Psymberin-Genclusters mit Lage der Ketosynthasen 1–3.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

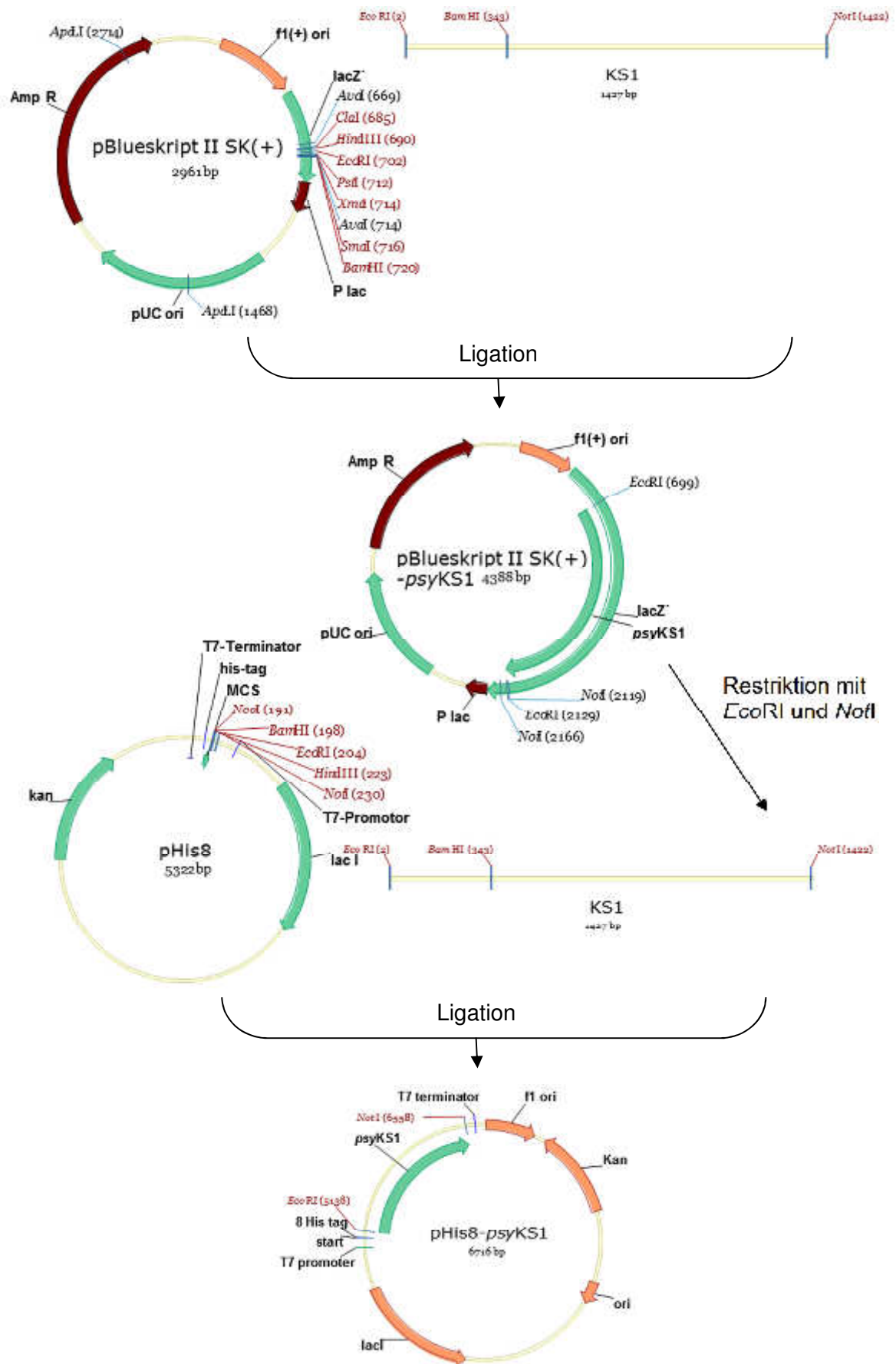


Abbildung 56: Klonierungsstrategie für KS1; MCS: multiple cloning site.

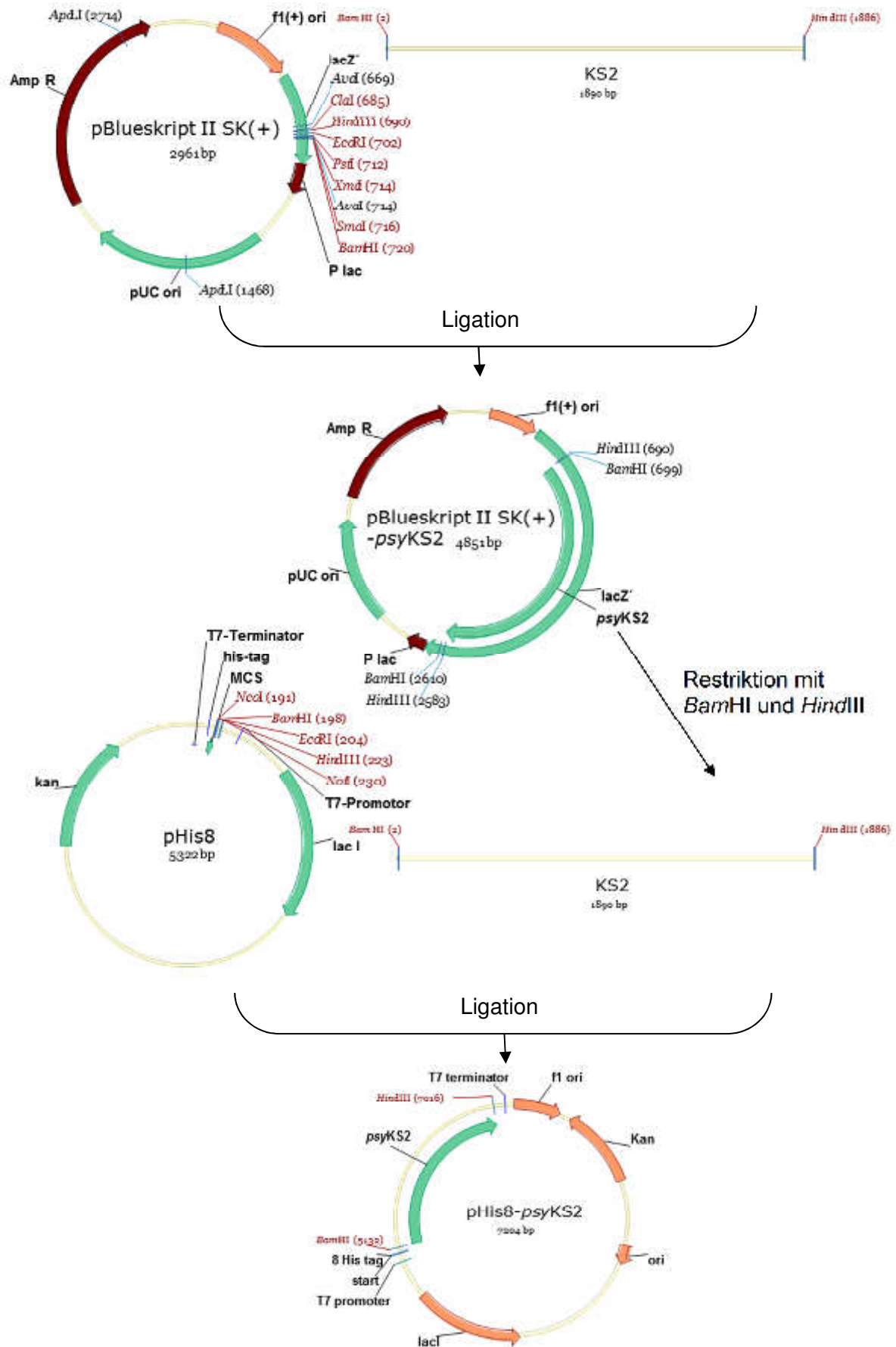


Abbildung 57: Klonierungsstrategie von KS2; MCS: multiple cloning site.

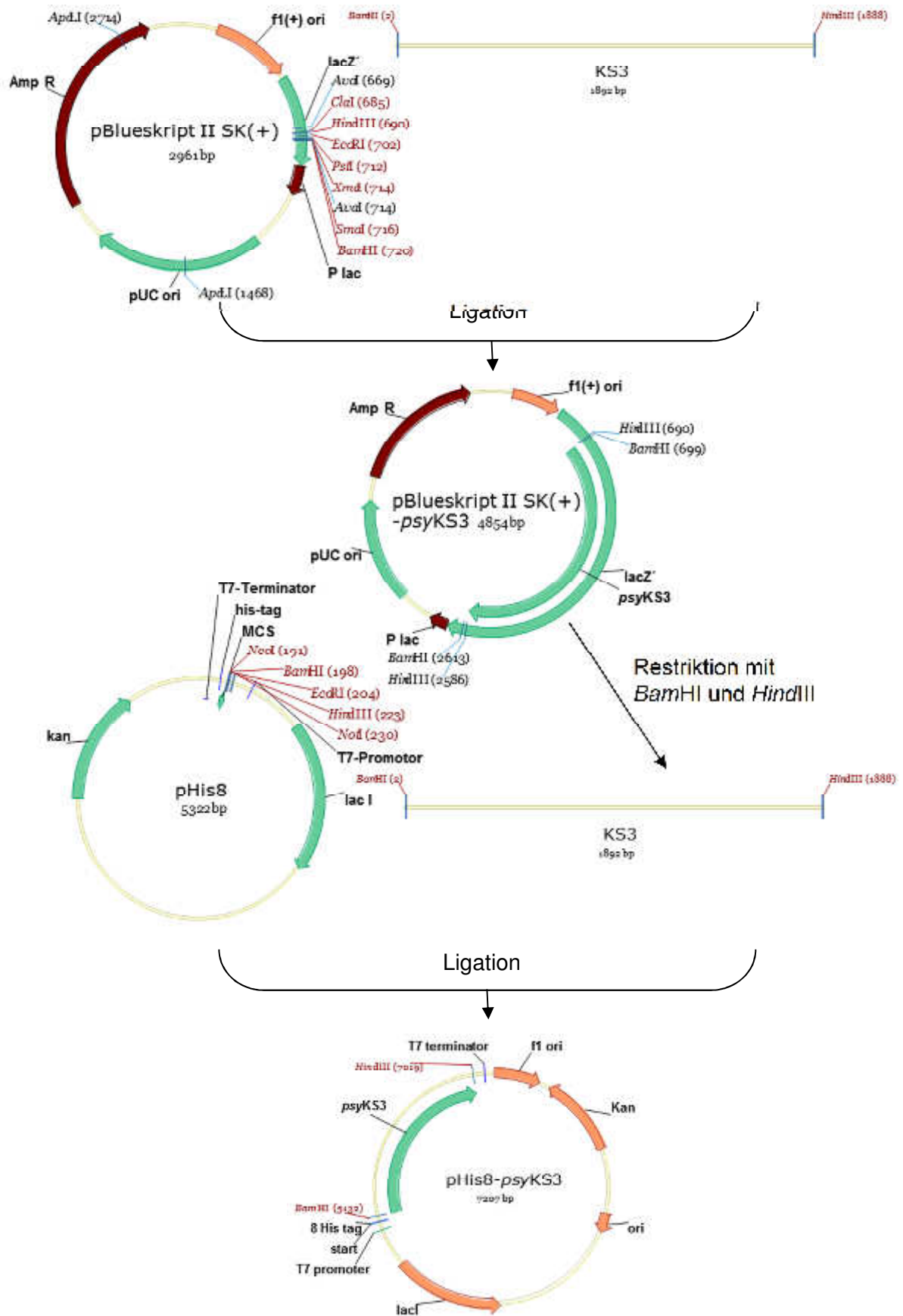


Abbildung 58: Klonierungsstrategie von KS3; MCS: multiple cloning site.

3.1.3.1 Konstruktion der KS-Expressionsplasmide

Zunächst wurden spezifische Primer für die PCR-Amplifikation aus dem Psymberin-Gencluster entworfen. Durch Überhänge der Primer wurden Schnittstellen für Restriktionsenzyme angefügt, die eine gerichtete Klonierung der PCR-Produkte ermöglichten. Im Detail wurden für KS1 die Restriktionsenzyme *NotI* und *EcoRI* ausgewählt (Abbildung 56). Für KS2 sowie KS3 wurden die Restriktionsenzyme *BamHI* sowie *HindIII* verwendet (Abbildungen 57-58). Die erwarteten PCR-Produkte hatten eine Größe von 1410 bp für KS1, 1875 bp für KS2 und 1892 bp für KS3.

Nach der PCR mit DNA aus dem Psymberin-Gencluster wurden die Ansätze auf ein Agarosegel (1%) aufgetragen und das gewünschte PCR-Produkt extrahiert. Die Extraktion wurde per Gelelektrophorese überprüft (Abbildung 59).

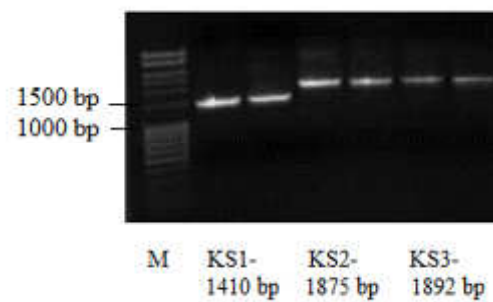


Abbildung 59: Agarosegel (1%) der PCR-Produkte. Die PCR-Produkte besitzen die korrekte Größe von 1410 bp, 1875 bp und 1892 bp; M: Marker.

Die PCR-Produkte wurden dann zunächst in den Vektor pBluescript II SK(+) kloniert, der den Vorteil bietet, Klone mit Insert im Vektor mittels Blue/White Screening direkt identifizieren zu können. Durch Restriktion mit *EcoRV* und anschließender Einführung von 3'-dTTP-Überhängen wird aus dem Vektor pBluescript II SK(+) der T/A-Vektor dargestellt. Er besitzt ein überhängendes Thyminnukleotid, das zuvor durch eine Desoxyribonukleotidyltransferase unter Verwendung von Didesoxy-Thyminnukleotiden angefügt wird. Dadurch kann er mit A-Überhängen des PCR-Produktes ligiert werden.¹¹⁴ Durch Restriktionsverdau wurde jeweils überprüft, ob sich das Insert im Vektor befand (Abbildung 60). Alle Verdau erwiesen sich als positiv. Die positiven Plasmide wurden sequenziert. Es wurde für alle drei Konstrukte die richtige Sequenz gefunden.

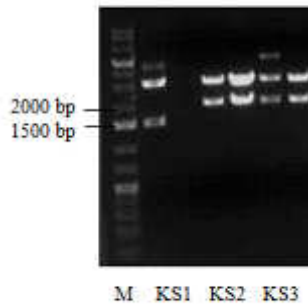


Abbildung 60: Überprüfung der Konstrukte im TA-Vektor. Die Banden zeigen die richtigen Größen von 1410 bp für KS1, 1875 bp für KS2 und 1892 bp für KS3 sowie den religierten Vektor bei 5322 bp und unverdaute Konstrukte; M: Marker.

Das jeweilige Insert wurde, um es aus dem pBluescript II SK(+)-Vektor zu entfernen, aus dem Vektor geschnitten und mittels Gelextraktion aufgereinigt.

3.1.3.2 Ligation in den Expressionsvektor pHis8

Der Vektor pHis8 ist der Expressionsvektor für die Ketosynthasedomänen. Bei der Translation wird an dem *N*-Terminus des Proteins ein His8-Tag angefügt, durch den die Proteine über Ni-NTA-Säulen, die einen Nickel-Chelat-Komplex mit dem His-Tag bilden, aufgereinigt werden können. Die Elution erfolgt dabei mittels unterschiedlicher Konzentrationen von Imidazol, das an die Nickelionen des Säulenmaterials bindet und das Protein als Ligand austauscht.

Die Genfragmente wurden in pHis8 ligiert und die Ligationsmischung erneut in *E. coli* XL1blue transformiert. Die Konstrukte wurden geschnitten und durch Restriktionsverdau überprüft (Abbildung 61-62). Erfolgreich sequenziert wurden die Konstrukte KS2-C, sowie KS3-C und KS3-D.

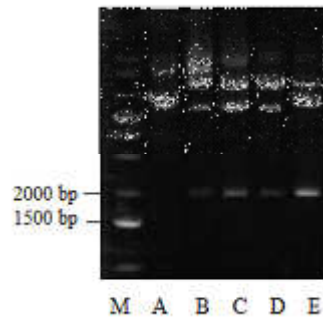


Abbildung 61: Testverdau der Konstrukte für KS2 in pHis8 KS2: 1875 bp. Ebenfalls zu sehen: religierter Vektor bei 5322 bp und unverdaute Konstrukte; erfolgreich sequenziert: Konstrukt KS2-C; A-E: verschiedene Klone von KS2; M: Marker.

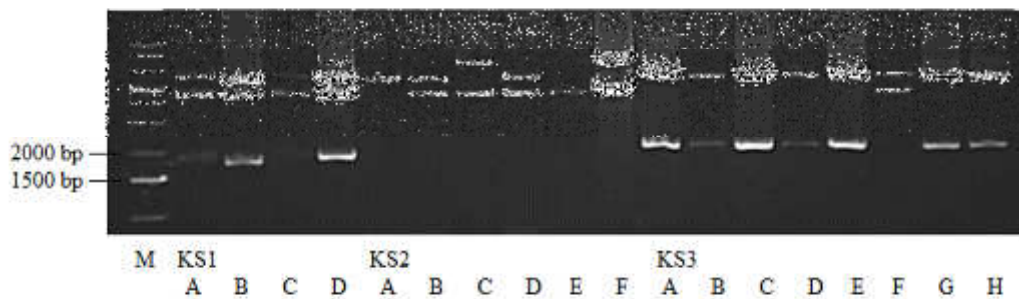


Abbildung 62: Testverdau der Konstrukte in pHis8; KS3: 1892 bp. Ebenfalls zu sehen: religierter Vektor bei 5322 bp und unverdaute Konstrukte; erfolgreich sequenziert: Konstrukt KS3-C und KS3-D; A-H: verschiedene Proben der jeweiligen KS, M: Marker.

Da sich im Falle von KS1 zwar positive Konstrukte finden ließen, sich das Protein jedoch nicht exprimieren ließ, wurde eine neue Klonierungsstrategie mit neuen Primern entwickelt (Abbildung 63). Um eine direkte Ligation nach der PCR in pHis8 vornehmen zu können, wurden A-Überhänge an den Anfang des Primers gesetzt. Hiermit wurde gewährleistet, dass das Restriktionsenzym in der Lage ist, das PCR-Produkt zu schneiden. Die Primer wurden auch in Bezug auf die Annealingtemperatur (Anzahl der Cytosin- und Adenosinfragmente) und auf die spätere Löslichkeit optimiert, indem eine besser wasserlösliche Aminosäure an den Anfang gesetzt wurde (Tabelle 2).

Tabelle 2: Verwendete Aminosäuren zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit der KS1-Enzyme.

Primer	Aminosäure
KS1 <i>EcoRI</i> for-2'	Asparaginsäure
KS1 <i>EcoRI</i> for-2	Serin
KS1 <i>NotI</i> rev	Serin

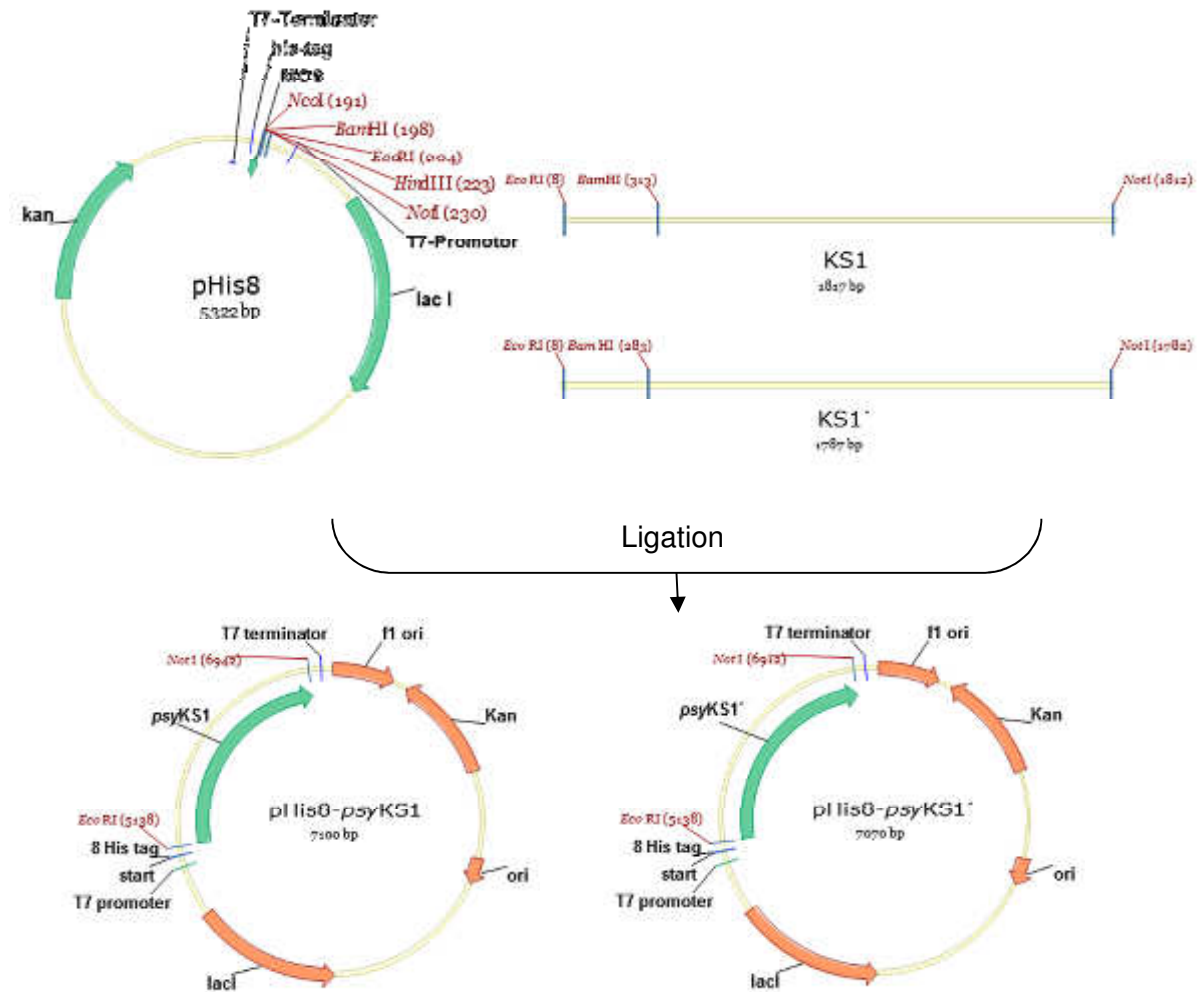


Abbildung 63: Neue Klonierungsstrategie von KS1 und KS1'; MCS:multiple cloning site; KS1: Primer KS1*EcoRI*for-2, KS1': Primer KS1*EcoRI*for-2'.

Die neuen Größen der Konstrukte waren für KS1 1804 bp und für KS1' 1774 bp.

Eine Phusion-PCR (siehe Abschnitt 4.3.7) war unter allen getesteten Bedingungen erfolgreich (Abbildung 64).

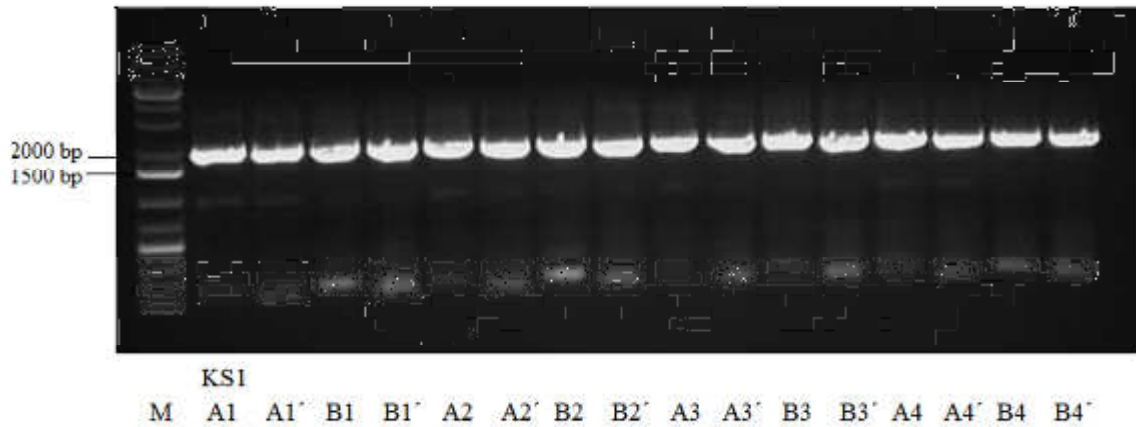


Abbildung 64: Agarosegel (1%) der PCR-Produkte. Die PCR-Produkte besitzen die korrekte Größe von 1804 bp und 1774 bp; A: DNA 1:10 verdünnt, B: DNA unverdünnt, A/B: Primer 1, A'/B': Primer 2, 1-4: Temperaturgradient, 1: 50.5 °C, 2: 55.3 °C, 3: 60.7 °C, 4: 65.1 °C; M: Marker.

Nach der PCR wurde die DNA aufgereinigt und mit den Enzymen *EcoRI* und *NotI* geschnitten (Abbildung 65).

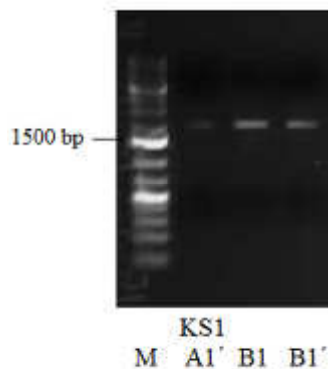


Abbildung 65: Überprüfung des Verdau der PCR-Produkte für eine Klonierung mittels eines Agarosegels (1%), die Banden zeigen das erwartete Produkt bei 1804 und 1774 bp; A1'-B1': verschiedene Proben von KS1, M: Marker.

Die Konstrukte B1 sowie B1' wurden in pHis8 ligiert und in *E. coli* X11blue transformiert. Es folgte ein Testverdau, bei dem sich B1a und B1'b als positiv erwiesen (Abbildung 66).

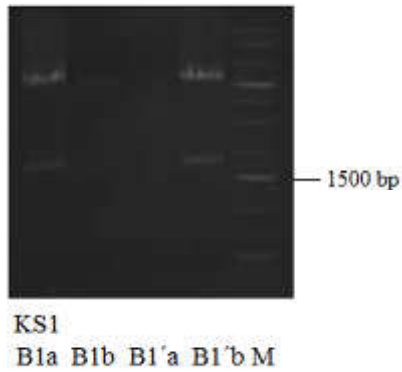


Abbildung 66: Testverdau von KS1 und KS1' in pHis8. Die Banden zeigen das erwartete Produkt bei 1804 und 1774 bp; B1A-B1'b: Verschiedene Klone von KS1, M: Marker.

Die korrekte Klonierung wurde bei beiden Konstrukten mittels Sequenzierung bestätigt.

3.1.3.3 Expression von KS1, KS2 und KS3

Für die Produktion der Ketosynthasedomänen wurden die Konstrukte in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Nach der Standardmethode mittels Ni-NTA Chromatographie (siehe Abschnitt 4.3.14.3) gelang es, die Proteine aufzureinigen (Abbildung 67). Für KS2 wurde eine Größe von 69.6 kDa erwartet, für KS3 eine Größe von 70.8 kDa.

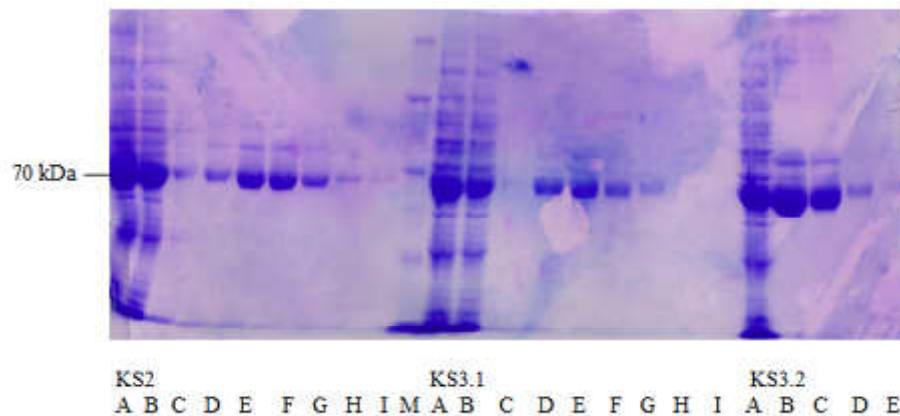


Abbildung 67: Expression von KS2 und KS3; A: Überstand, B: Pellet, C: Durchfluss, D: Waschfraktion, E: Imidazol 50 mM, F: Imidazol 100 mM, G: Imidazol 150 mM, H: Imidazol 200 mM, I: Imidazol 250 mM, M: Marker.

Für KS1' wurde eine Größe von 65.1 kDa und für KS1 eine Größe von 66.2 kDa erwartet. Beide Enzyme wurden erfolgreich produziert (Abbildung 68). Für weitere Versuche in Nottingham wurden die Enzyme KS1' (in folgenden Abschnitten als KS1 bezeichnet) sowie KS2 und KS3 verwendet.

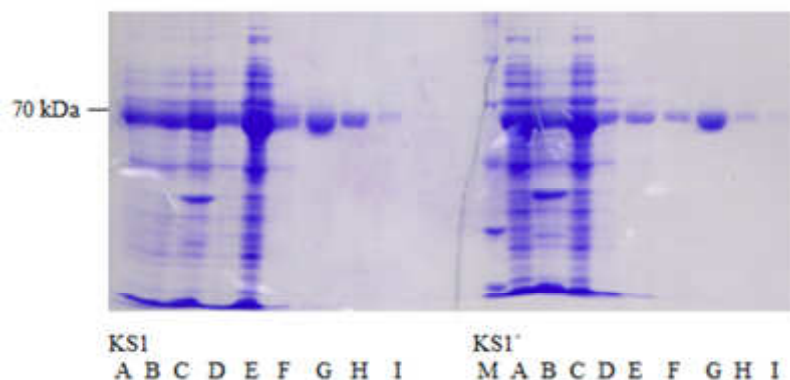


Abbildung 68: Expression von KS1 und KS1'; A: Überstand, B: Pellet, C: Durchfluss, D: Waschfraktion, E: Imidazol 50 mM, F: Imidazol 100 mM, G: Imidazol 150 mM, H: Imidazol 200 mM, I: Imidazol 250 mM, M: Marker.

3.1.4 Assays zur Überprüfung der Enzymaktivität der KS1-3

Für die Durchführung der Assays mit den KS1-3 aus dem Psymberin-Gencluster (Abbildung 25), sowie der KS5 aus dem Bacillaen-Gencluster, die von Dr. Annette Kampa exprimiert wurde (Abbildung 36) und PedC aus dem Pederin-Gencluster, das von Dr. Katrin Zimmermann exprimiert wurde (Abbildung 30), wurden die in Abschnitt 3.1.2 synthetisierten Thioester **36-43** verwendet (Abbildung 69). Die Thioester **S-37** sowie **R-37** wurden im Rahmen der Dissertation von Dr. Christoph Kohlhaas dargestellt.¹¹⁵

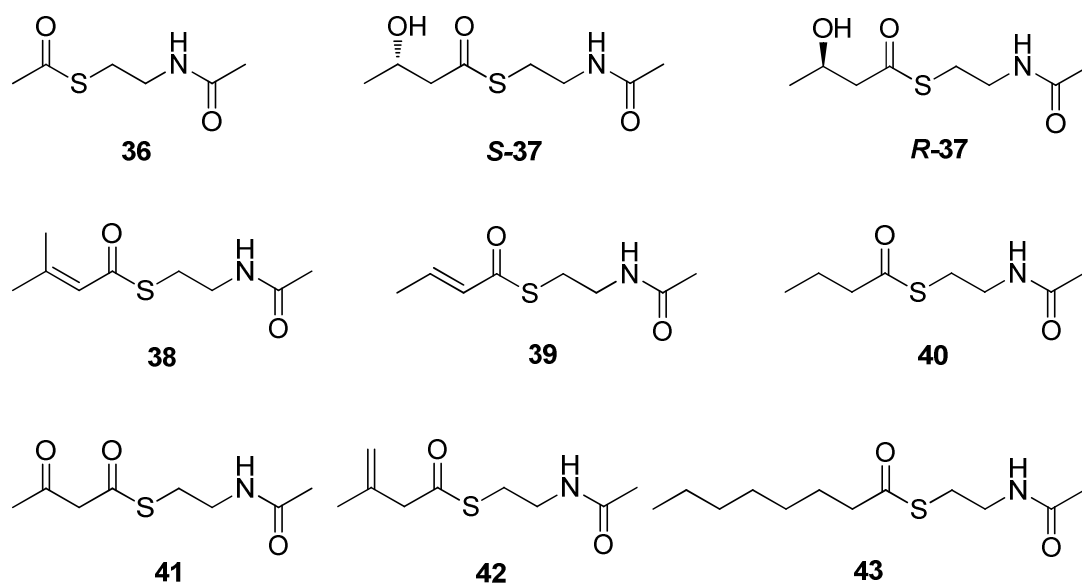


Abbildung 69: Für die KS-Assays synthetisierte Thioester 36-43.

3.1.4.1 Untersuchungen an KS1 (PsyA) aus der Psymberin-PKS

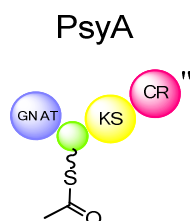


Abbildung 70: Ausschnitt des Psymberin-Biosyntheseproteins PsyA, das KS1 enthält.

Die KS1 aus der Psymberin-PKS ist für eine Kettenverlängerung eines Acetyl-Substrats verantwortlich (Abbildung 70). Umsetzung der SNAC-Derivate **36-42** mit dieser KS zeigte eine schwach ausgeprägte Ladespezifität. KS1 akzeptierte sowohl verzweigte als auch unverzweigte Thioester.¹¹⁶ Das Butyryl-Substrat **40** acylierte die KS ebenso wie der Thioester **36**, der das Standardsubstrat dieser KS darstellt. Dies zeigt, dass die Kettenlänge des Substrats zumindest *in vitro* eine untergeordnete Rolle spielt. Ebenso gut wurden der β -Ketothioester **41** und die beiden β -Hydroxythioester **R-37** und **S-37** gebunden. Ausnahme waren die Thioester **38** und **42**, die an der β -Position eine Verzweigung zu einem Kohlenstoffatom aufwiesen. Diese acylierten die KS etwa 30 Mal langsamer als die unverzweigten Analoga (Abbildung 71). Obwohl anfangs vermutet wurde, dass diese KS aufgrund ihrer Anfangsstellung im Gencluster eine besonders hohe

Substratspezifität zeigt, ist die KS1 in der Lage, eine Vielfalt an verschiedensten Substraten zu akzeptieren, die sich zum Teil erheblich von ihrem Standardsubstrat, dem Acetylthioester **36** unterscheiden. Dies könnte anhand der GNAT-Domäne (GCN5-verwandte *N*-Acetyltransferase- (GNAT) Domäne) erklärt werden, die für die Initiierung der Biosynthese verantwortlich ist. Diese ist in der Lage, spezifisch das Acetylsubstrat auszuwählen, das dann an die KS weitergereicht wird. Somit entfällt für die KS der Zwang selbst selektiv zu sein.

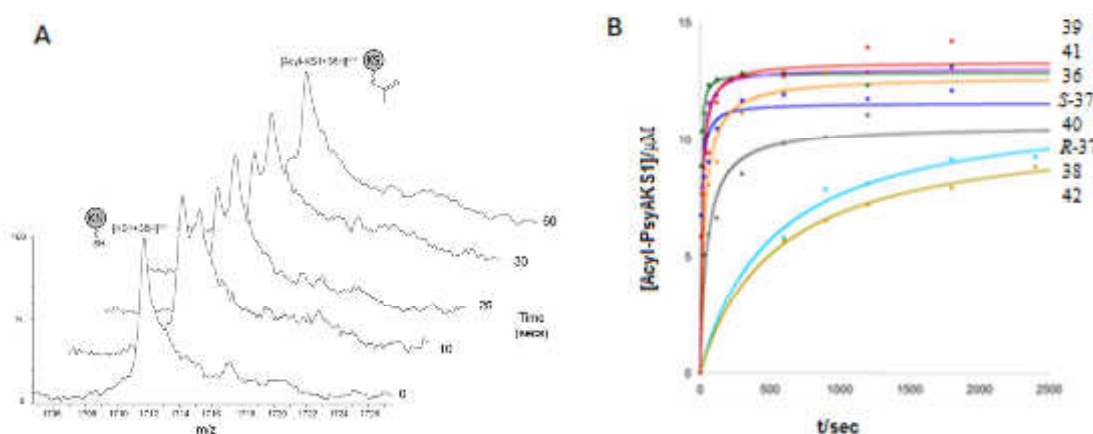


Abbildung 71: A: Zeitlicher Verlauf der Massenspektren beim Beladen der PsyA-KS1 mit Tests substrat 36; B: Kinetischer Plot, der die Acylierung von PsyA-KS1 mit den unterschiedlichen Substraten verdeutlicht.

3.1.4.2 Untersuchungen an KS2 (PsyA) aus der Psymberin-PKS

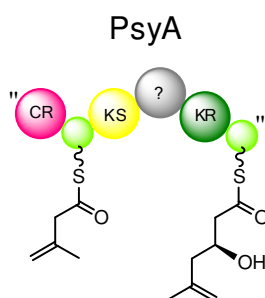


Abbildung 72: Ausschnitt des Psymberin-Biosyntheseproteins PsyA, das KS2 enthält.

Für KS2 trägt das putative natürliche Intermediat eine Exomethylengruppe in β -Stellung (Abbildung 72). KS2 zeigte eine ähnlich unspezifische Ladeaktivität wie KS1. Alle inkubierten Thioester **36-42** acylierten die KS. Überraschenderweise acylierte der Thioester **42** zehn Mal langsamer als das unverzweigte Intermediat **40**. Auch die anderen

unverzweigten Thioester **36** und **39** sowie der β -Oxothioester **41** wurden **42** vorgezogen. Einzig der verzweigte Thioester **38** und die β -Hydroxythioester **R-37** sowie **S-37** acylierten langsamer als das natürliche Intermediat **42** (Abbildung 73). Ein Grund hierfür ist vermutlich der geringere sterische Anspruch der unverzweigten Thioester **36**, **39** und **40**.

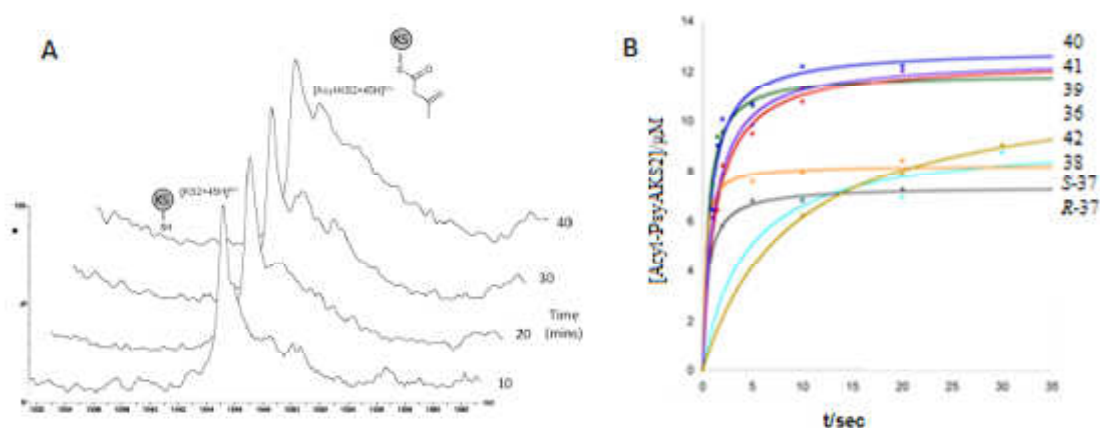


Abbildung 73: A: Zeitlicher Verlauf der Massenspektren beim Beladen der PsyA-KS2 mit Substrat 42; B: Kinetischer Plot, der die Acylierung von PsyA-KS2 mit den unterschiedlichen Substraten verdeutlicht.

3.1.4.3 Untersuchungen an KS3 (PsyD) aus der Psymberin-PKS

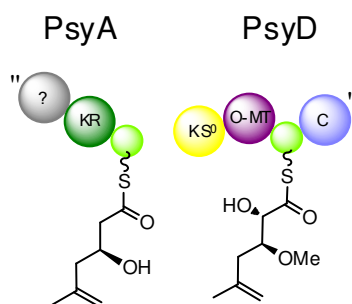


Abbildung 74: Ausschnitt des Psymberin-Biosyntheseproteins PsyD, das KS3 enthält; Hydroxyfunktion in α -Position wird vermutlich von PsyK eingeführt.

KS3 ist eine nicht-verlängernde KS (KS⁰), die einen (*S*)- β -Hydroxythioester als Substrat in der Biosynthese besitzt (Abbildung 74). Bei genauer Betrachtung der Spezifität dieser KS fällt etwas Bemerkenswertes auf: Die unverzweigten Thioester **36**, **39** und **41** sind in der Lage KS3 in guten Raten zu acylieren, auch wenn der β -Oxothioester **41** das beste Intermediat zu sein scheint. Die verzweigten Intermediate **38** und **42** wurden jedoch nicht akzeptiert (Abbildung 75).

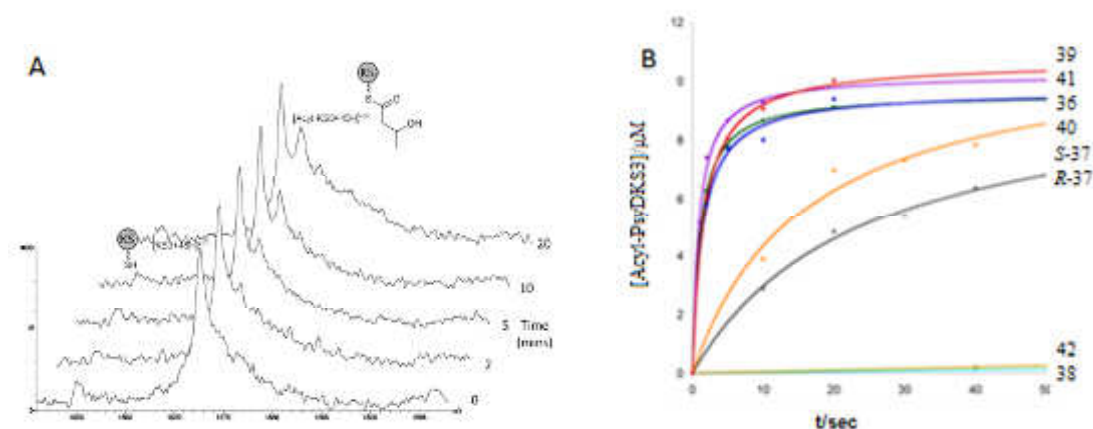


Abbildung 75: A: Zeitlicher Verlauf der Massenspektren beim Beladen der PsyD-KS3 mit Tests substrat 37; B: Kinetischer Plot, der die Acylierung von PsyD-KS3 mit den unterschiedlichen Substraten verdeutlicht.

Um eine genauere Spezifität gegenüber den β -Hydroxythioestern *R,S*-37 angeben zu können, wurden sowohl der (*S*)- als auch der (*R*)-Hydroxythioester *S*-37 und *R*-37 genauer betrachtet.¹¹⁵ Hierbei wurde eine geringe Bevorzugung des (*S*)-konfigurierten Thioesters *S*-37 beobachtet, was auch der Konfiguration des natürlichen Substrats entspricht (Abbildung 76).

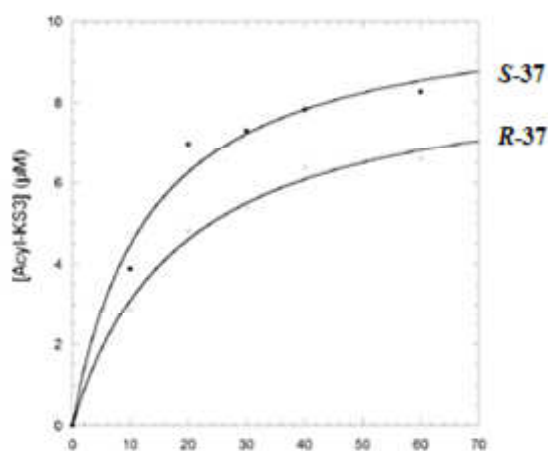
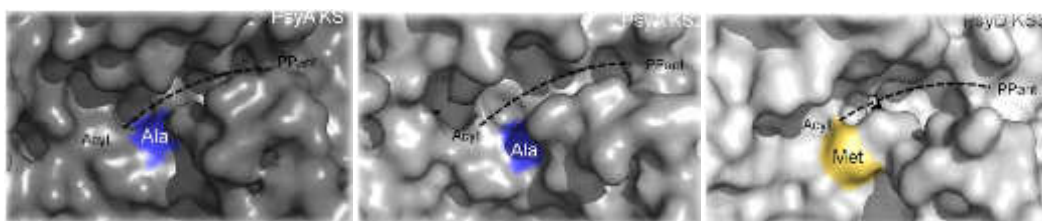
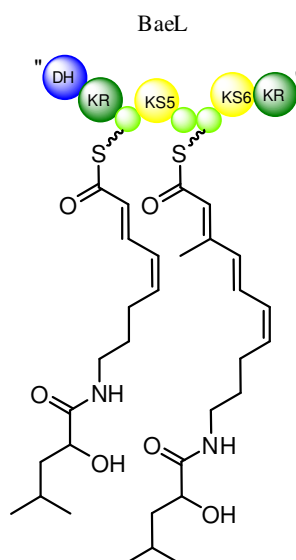


Abbildung 76: Kinetischer Plot, der die Acylierung von PsyD-KS3 mit den β -Hydroxythioestern *R,S*-37 verdeutlicht.

Eine Erklärung, warum die KS3 keine β -kohlenstoffverzweigten Intermediate akzeptiert, liefert ein Homologie-Modell (Abbildung 77). Die β -Hydroxythioester *R/S*-37 werden trotz β -Verzweigung akzeptiert, da sie potentielle Wasserstoffbrückenbindungsdonoren sind. So befindet sich im Fall der KS3 ein Methionin (Met-Cys), direkt vor dem aktivierten Cystein (Cys) des Proteins, bei KS1 und KS2 befindet sich dort ein Alanin



3.1.4.4 Untersuchungen an Bae-KS5 aus der Bacillaen-PKS



Die synthetisierten Testsubstrate **36-41** wurden auch als Testsubstrate für die KS5 der Bacillaen-PKS getestet. Bae-KS5 wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Dr. Annette Kampa überproduziert. Das vorhergesagte Substrat ist in diesem Fall ein (*E*)-2-Butenoyl-Thioester, was sich auch in der Spezifität der KS5 zeigte (Abbildung 78). So wurde keine Acylierung bei den β -kohlenstoffverzweigten Substraten **38** und **42** beobachtet. Der am besten acylierende Thioester war das α,β -ungesättigte Substrat **39**. In vergleichbaren Raten wurden auch die unverzweigten Thioester **36** und **40** akzeptiert (Abbildung 79).

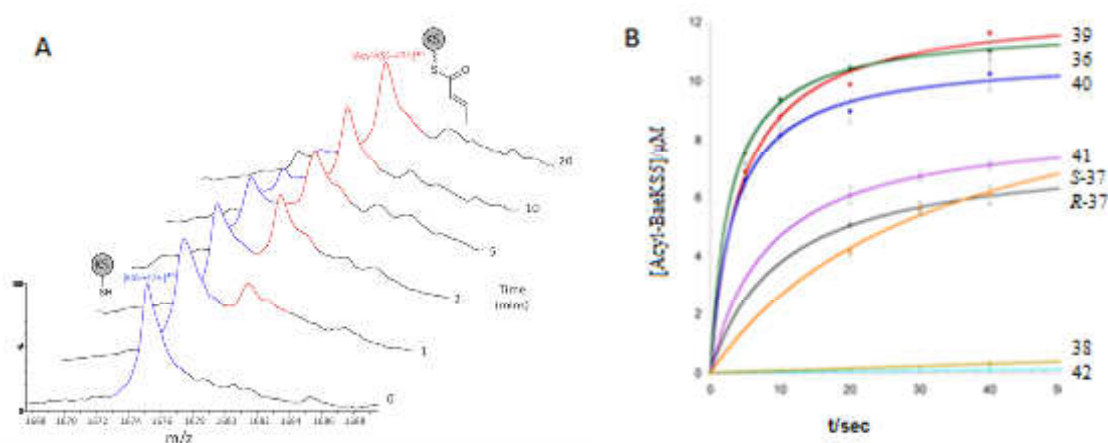


Abbildung 79: A: Zeitlich aufgelöste Massenänderung von KS5 aus dem Bacillaen Gencluster mit Testsubstrat 38; B: Kinetischer Plot, der die Acylierung von Bae-KS5 mit den unterschiedlichen Substraten verdeutlicht.

Die geringe Affinität der KS5 zu verzweigten Substraten lässt sich durch deren sterischen Anspruch erklären. Wie das Homologie-Modell zeigt (Abbildung 80), befindet sich, ähnlich zu KS3 des Psymberin-Genclusters, am aktiven Zentrum des Proteins ein Methioninrest, der durch seine Struktur die Bindung eines verzweigten Thioesters verhindert.

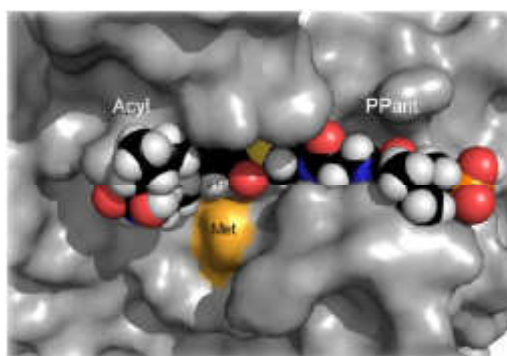


Abbildung 80: Bindungsmodell für Bae-KS5.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass für KS-Domänen, die kohlenstoffverzweigte Substrate akzeptieren, die Aminosäure neben dem aktiven Zentrum immer Glycin oder Alanin ist. Durch Erzeugung einer Mutante von Matthew Jenner aus dem AK Oldham, bei der der Methioninrest gegen einen Alaninrest ausgetauscht wurde, wurde diese These bewiesen.¹¹⁶ Die Mutante akzeptierte auch die β -kohlenstoffverzweigten Intermediate **38** und **42**. Bei *cis*-AT-PKS befindet sich neben dem aktiven Zentrum immer ein Alanin-Rest.

3.1.4.5 Untersuchungen an ACP3 (PsyA) aus der Psymberin-PKS

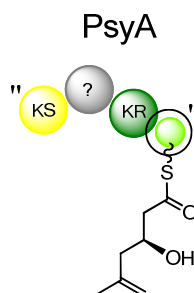


Abbildung 81: Ausschnitt der Psymberin-Biosynthese mit ACP3.

Weitere Versuche wurden mit Acylcarrierproteinen (ACPs) durchgeführt, die die wachsende Kette über einen Phosphopantetheinylarm gebunden haben (siehe Abschnitt 1.1.2). PsyA-ACP3 aus der Psymberin-PKS (Abbildung 81) wurde bereits von Dr. Holger Niederkrüger kloniert und überproduziert.⁷² Acyl-gebundene ACPs sind die natürlich verwendeten Intermediate in PKS. Deshalb ist es sinnvoll, diese in Enzymassays einzusetzen anstatt der häufig verwendeten *N*-Acetylcysteamin-/ CoA-Thioestern, welche diese nur imitieren.

Die gängigste Methode zur Darstellung von Acyl-ACPs führt über den enzymatischen Transfer der PPant-Gruppe eines Acyl-CoA-Esters auf ein *apo*-ACP mit Hilfe der *holo*-ACP-Synthase.¹¹⁷ Diese Möglichkeit besitzt viele Nachteile, so ist die Synthese der CoA-Substrate im Vergleich zu der Synthese der SNAC-Substrate oft komplizierter und teurer.¹¹⁸ Mit den synthetisierten Thioestern **36**, **40**, **43** und einigen weiteren Testsubstraten, die im Rahmen der Promotion von Dr. Christoph Kohlhaas hergestellt wurden,¹¹⁵ sollte nun eine einfache Methode für die Synthese von Acyl-ACPs aus SNAC-Thioestern entwickelt werden. Diese Acyl-ACPs sollten direkt in Assays mit KS1 umgesetzt werden. Hierbei wurde die von mir exprimierte KS1 sowie einige der von mir synthetisierten Thioester (siehe Abschnitt 3.1.2) verwendet. Die Assays und weitere molekularbiologische Arbeiten wurden von Matthew Jenner aus dem AK Oldham durchgeführt. So wurde von Matthew Jenner eine Mutante des Psymberin-ACP3 angefertigt, bei der die C-terminalen Aminosäuren Cystein und Valin entfernt wurden, da sie ebenfalls eine Acylierung eingehen können. Alle drei Thioester wurden in guten Ausbeuten von 85% – 95% auf das *holo*-ACP übertragen (Abbildung 82).

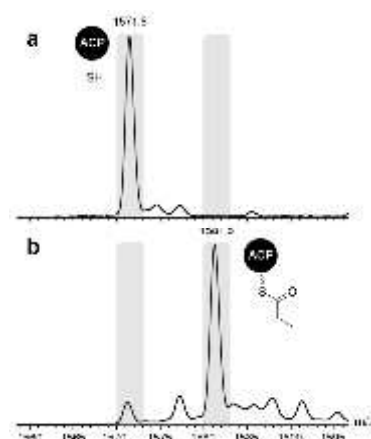


Abbildung 82: Umsetzung des *holo*-ACP PsyA-ACP3 zum Acyl-ACP am Beispiel des Butyryl-Thioesters 40; a: freies ACP, b: ACP mit gebundenem Acyl-Substrat.

Das *holo*-ACP wurde anschließend von Matthew Jenner in einem Assay mit KS1 der Psymberin-PKS umgesetzt. Hierbei wurde eine Abnahme der Signalintensität des Acyl-ACP und eine Zunahme der Signalintensität des *holo*-ACP beobachtet (Abbildung 83).

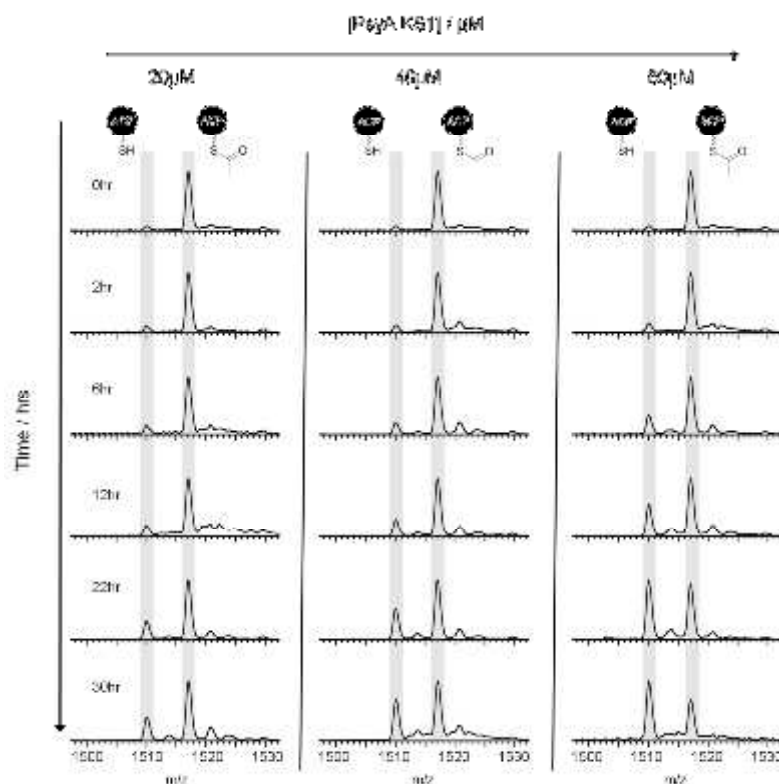


Abbildung 83: Massenspektrum der Beladung von PsyA-KS1 mittels PsyA-ACP3. Zu Beobachten ist eine Intensitätsabnahme des Acyl-ACP-Signals und eine Intensitätszunahme des *holo*-ACP-Signals. Je größer die Konzentration der PsyA-KS1, desto größer die Abnahme des Acyl-ACP.

Je größer die Konzentration der KS1, desto größer war auch die Umsetzung des Acyl-ACP, was darauf schließen lässt, dass die KS für eine Abspaltung des Acylderivats verantwortlich ist (Abbildung 84). Vorteile dieser Methode liegen darin, dass das Acyl-ACP dem ursprünglichen Intermediat der Biosynthese ähnlicher ist und somit die Reaktionsbedingungen denen in der Natur eher entsprechen. Auch ist die Deacylierung des kleineren ACPs einfacher zu messen als die Acylierung der großen KS-Domäne.

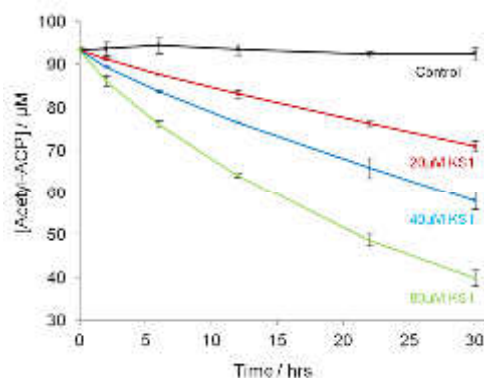


Abbildung 84: Kinetischer Plot des Acyl-Transfers von Acetyl-ACP auf KS1.

3.1.4.6 Untersuchungen an AT2 (PedC) aus der Pederin-PKS

PedC ist eine AT aus der Pederin PKS. In Pederin existieren zwei AT, wobei PedD zu den besser erforschten Malonyltransferasen (AT1) gehört und PedC zu den bisher wenig erforschten Homologen (AT2), deren Funktion lange unbekannt war. *In vitro*-Studien haben gezeigt, dass PedC eine Hydrolyse von Acyl-Thioestern und Acyl-ACPs katalysiert.¹¹⁹ Es war unter anderem in der Lage, die von mir synthetisierten Thioester **R/S-37** und **39** zu hydrolysieren. Längere oder verzweigte α/β -ungesättigte Thioester, wie **38** wurden nicht hydrolysiert. Es war ebenfalls in der Lage, Acetyl- und Hexanoyl-ACPs zu hydrolysieren, jedoch überraschenderweise nicht Malonyl-ACP, das ein wichtiger Vorläufer der Polyketid-Biosynthese ist.¹¹⁹ Dies deutet darauf hin, dass PedC eine Korrekturlesefunktion in der PKS besitzt.

PedC wurde von Dr. Holger Niederkrüger kloniert und überproduziert.⁷² Die Assays wurden von Katja Jensen aus dem AK Piel durchgeführt. Einige der verwendeten Thioester, wie **R/S-37**, **38** und **39** wurden von mir synthetisiert (siehe Abschnitt 3.1.2).

Um weitere Substrate in einem PedC-Assay auf dessen Hydrolyseaktivität zu testen, wurde die in Abschnitt 3.1.4.5 beschriebene vereinfachte Methode zur Generierung der Acyl-ACPs als Testsubstrate verwendet.

Diese Assays wurden von Matthew Jenner aus dem AK Oldham durchgeführt. PedC war auch bei diesen Versuchen in der Lage, das einfachste Acetyl-ACP zu spalten, beim Butyryl-ACP verringerte sich die Geschwindigkeit der Hydrolyse um die Hälfte. Je länger das Testsubstrat wurde, desto langsamer war die Hydrolyse, was darauf schließen lässt, dass PedC für kurze Intermediate zuständig ist. Auch verzweigte Substrate wurden langsamer hydrolysiert. Nicht hydrolysiert wurde das 2-Methyloxazol-4-carbonylthio-ACP, das von Dr. Christoph Kohlhaas synthetisiert wurde. Dies lässt darauf schließen, dass der fünfgliedrige Heterocyclus vom aktiven Zentrum in PedC nicht toleriert wird (Abbildung 85).

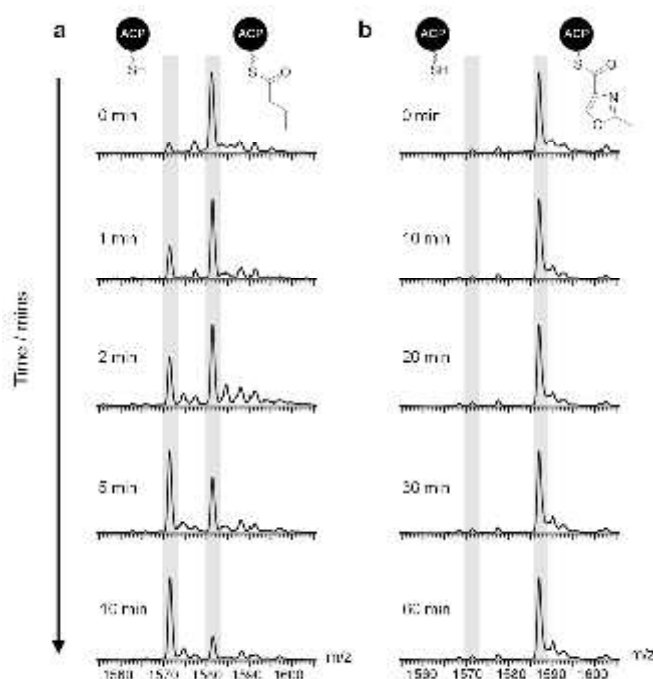


Abbildung 85: Umsetzung von Butyryl-ACP und 2-Methyloxazol-4-carbonylthio-ACP mit PedC, von denen nur das Butyryl-ACP toleriert und hydrolysiert wurde.

3.2 Untersuchungen der putativen *O*-Methyltransferase PsyD(*O*-MT) und der putativen α -Hydroxylasen PsyC und PsyK aus der Psymberin-PKS

3.2.1 Synthese des Standards 44b für Untersuchungen an PsyD(*O*-MT)

PsyD aus dem Psymberin-Gencluster enthält eine putative *O*-Methyltransferasedomäne (Abbildung 25). Diese ist vermutlich für eine Methylierung an einer Hydroxygruppe der wachsenden Kette verantwortlich. Um diese Funktion zu verifizieren, sollte der Thioester **44a** synthetisiert und in Proteinassays mit PsyD(*O*-MT) getestet werden (Abbildung 86).

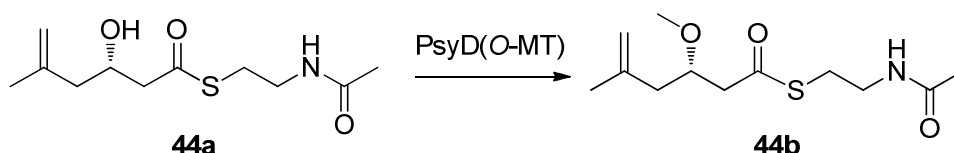


Abbildung 86: Vermutete Methylierung der Hydroxyfunktion von **44a** mit PsyD(*O*-MT).

Testsubstrat **44a** wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit synthetisiert (Abbildung 87).¹⁰⁵

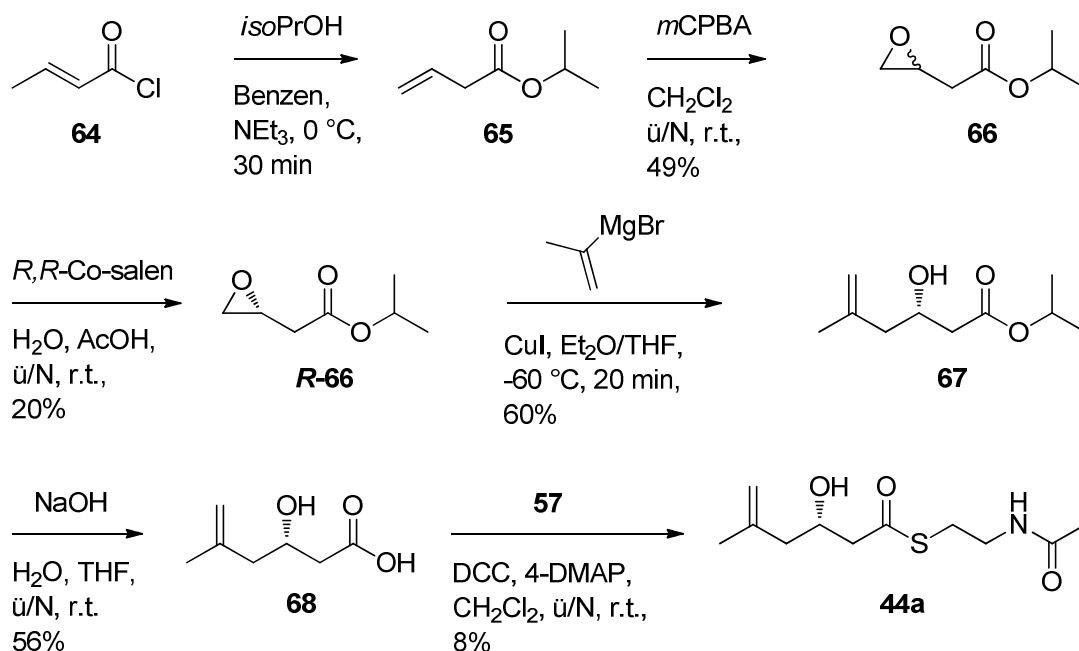


Abbildung 87: Darstellung des Intermediates **44a** für den PsyD(*O*-MT)-Assay im Rahmen der Diplomarbeit.

Die Syntheseroute begann mit einer Veresterung von *trans*-Crotonylchlorid (**64**), anschließend folgte ohne zwischenzeitliche Aufarbeitung eine Epoxidierung der terminalen Doppelbindung von **65** zum Substrat **66** mit einer Gesamtausbeute von 49%. Das Epoxid **66** wurde durch die nach Jeong *et al.* modifizierte Jacobsen-Epoxidierung¹²⁰ mit einer Ausbeute von 20% enantioselektiv in das (*R*)-Enantiomer **R-66** umgewandelt. Dieses wurde mittels einer Grignard-Reaktion mit Kupfer(I)iodid mit einer Ausbeute von 60% zur ungesättigten Verbindung **67** umgesetzt,¹²¹ dann wurde der Isopropylester **67** in 56% Ausbeute zur Säure **68** entschützt. Die Säure **68** wurde mittels DCC (Dicyclohexylcarbodiimid) und *N*-Acetylcysteamin (**57**) mit einer Ausbeute von 8% zum gewünschten Thioester **44a** gekoppelt.

Der Assay wurde unter Standardbedingungen (siehe Abschnitt 3.2.4) durchgeführt und über ESI-Massenspektrometrie vermessen. Da in den Spektren kein Produkt zu sehen war, wurde als mögliche Fehlerquelle vermutet, dass das Zielmolekül **44b** im Massenspektrum nicht detektierbar ist. Aufgrund dieser Vermutung und um generell eine bessere und schnellere Detektion des Assays per HPLC zu ermöglichen wurde **44b** als Standard synthetisiert. Dieses Molekül kann auch für den Assay von PsyK als Testsubstrat verwendet werden.

Die Synthese von **44b** sollte ausgehend vom kommerziell erhältlichen *trans*-Crotonylchlorid (**64**) erfolgen (Abbildung 88).¹⁰⁵ Dieses sollte in den Isopropylester **65** umgewandelt werden, der dann in das terminale Epoxid **66** umgewandelt werden sollte. Aus dem racemischen Epoxid sollte dann durch kinetische Racematspaltung das enantiomerenreine Epoxid **R-66** dargestellt werden, das dann durch eine Grignard-Addition mit Kupfer(I)iodid nukleophil geöffnet werden sollte. Der entstandene sekundäre Alkohol **67** sollte dann zum Intermediat **69** methyliert werden. Nach der Verseifung des Esters **69** zur Säure **70** sollte diese zum Thioester **44b** umgewandelt werden.

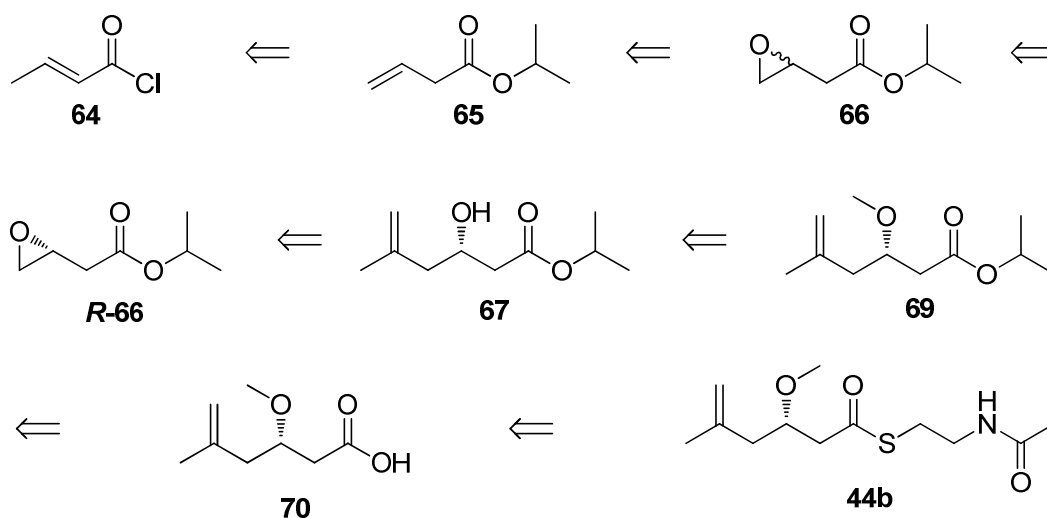


Abbildung 88: Retrosynthese des Thioesters **44b**.

Die ersten Schritte der Reaktionsführung entsprachen der Synthese des Substrats **44a** mit kleinen Modifikationen, so wurde die Ausbeute des enantiomerenreinen Epoxids **R-66** durch die Reaktionsführung nach Tokunaga *et al.*,¹²² bei der der Katalysator **71** vor Zugabe des Epoxids **66** durch Essigsäure zum Intermediat **72** aktiviert wurde, um 16% verbessert (Abbildung 89-90).

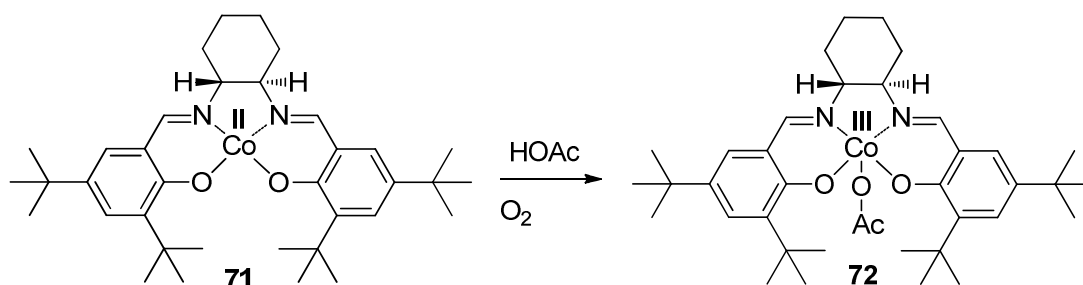


Abbildung 89: Aktivierung des *R,R*-Co(salen)-Komplexes **71** zu **72**.

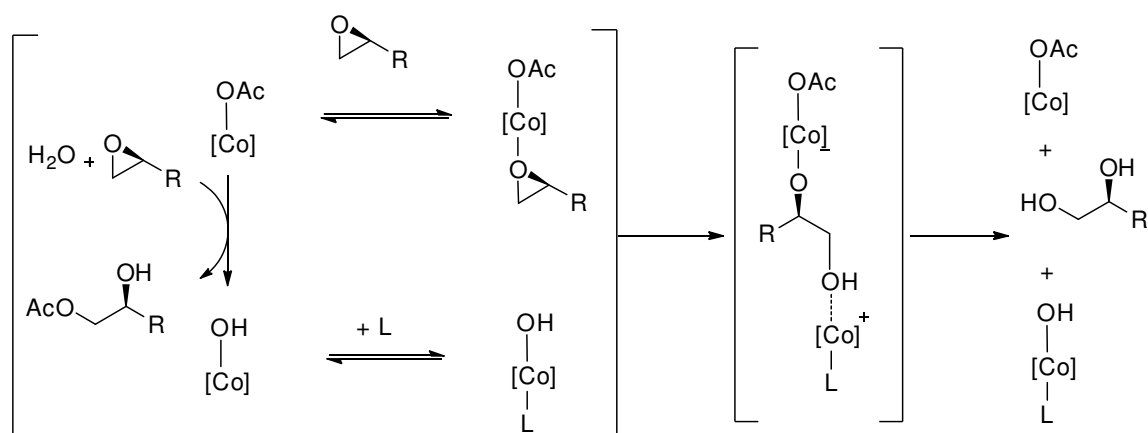


Abbildung 90: Mechanismus der Jacobsen-Epoxidierung.¹²²

Der *ee* lag noch immer bei 99%, was mittels HPLC-Messungen ermittelt wurde (Abbildung 91).

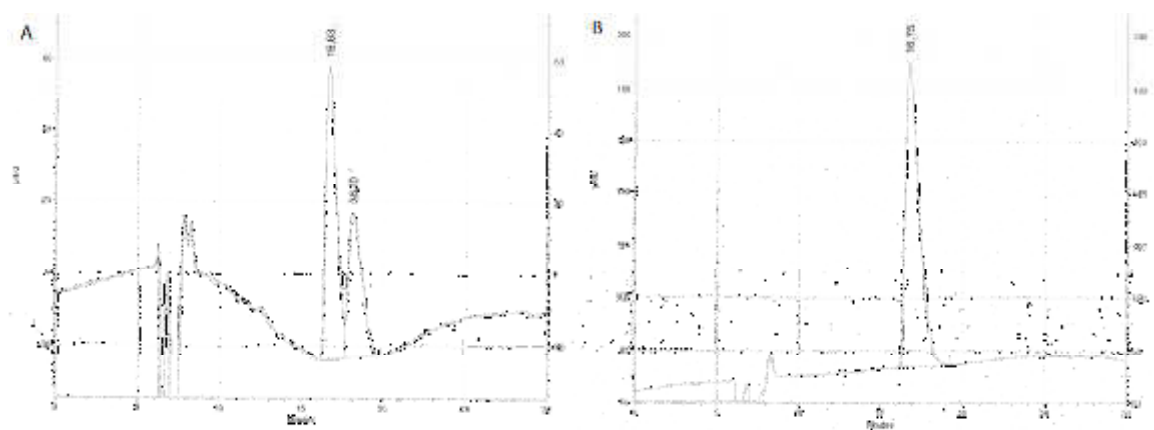


Abbildung 91: A: HPLC-Messung der Enantiomere *S,R*-66; B: HPLC-Messung des Enantiomers *R*-66.

Beim Versuch die Hydroxygruppe im Ester **67** mittels NaH und Methyljodid zu methylieren, wurde eine Eliminierung der Hydroxygruppe beobachtet, was zur Bildung des α,β -ungesättigten Systems **73** führte (Abbildung 92).

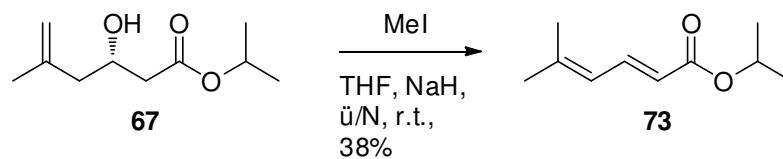


Abbildung 92: Eliminierung der Hydroxygruppe aus dem Substrat 61.

Ebenso misslang der Versuch der Methylierung mittels Lithiumbis(trimethylsilyl)amid als Base. Vermutlich komplexiert Lithium das Substrat **67** und verhindert somit die Methylierung (Abbildung 93).

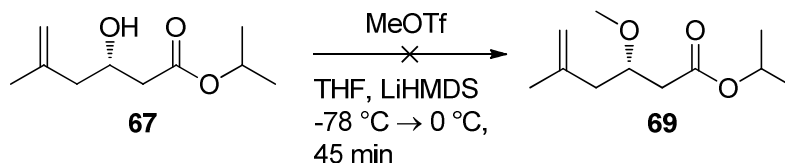


Abbildung 93: Versuch der Methylierung von **67** mittels LiHMDS als Base.

Eine erfolgreiche Methylierung wurde schließlich durch Verwendung von 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylpyridin und dem Methylierungsreagenz Methyltriflat mit einer Ausbeute von 30% erreicht. Trotz Eliminierungstendenzen konnte der Ester **69** dargestellt werden. Die basenkatalysierte Entschützung des Isopropylesters **69** ergab die Säure **70** in 51% Ausbeute (Abbildung 94).

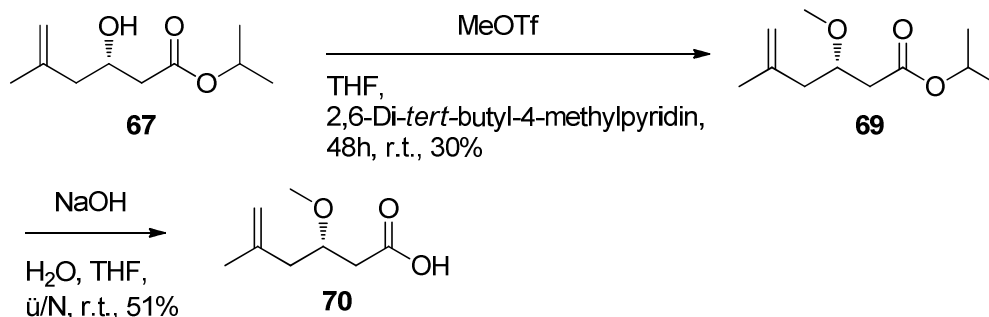


Abbildung 94: Methylierung des Substrates **67** mittels 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylpyridin und anschließende Entschützung des Isopropylesters **69**.

Bei der anschließenden Kupplungsreaktion mittels EDC statt DCC als Kupplungsreagenz wurde die Ausbeute um 59% auf 67% verbessert, was sich durch die im Standard **44b** geschützte Hydroxygruppe erklären lässt (Abbildung 95).



Abbildung 95: Kupplung des Intermediates 71 mittels EDC zum finalen Thioester 44b.

3.2.2 Synthese der Testsubstrate 45a und 45b für Untersuchungen an PsyC

Aufgrund der Homologie zu Phytanoyl-CoA Dioxygenasen ist PsyC putativ eine α -Hydroxylase aus dem Psymberin-Gencluster. Für die Verifizierung der biologischen Funktion wurde im Rahmen dieser Arbeit das Testsubstrat **45b** synthetisiert, das in *in vitro*-Assays mit PsyC umgesetzt wurde (Abbildung 96).

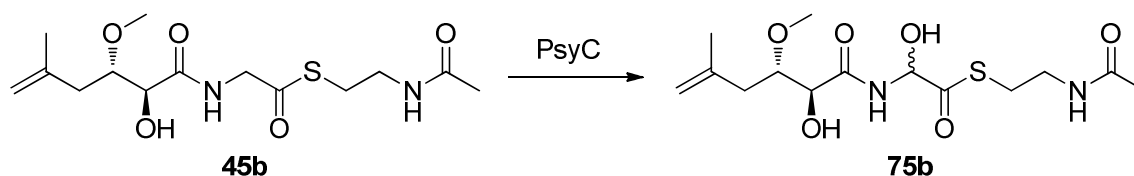


Abbildung 96: vermutete Hydroxylierung des Testsubstrates 45b mit PsyC. In der Psymberinbiosynthese wird die Hydroxygruppe durch ein weiteres Enzym methyliert.

Die Synthese des Testsubstrats **45b** sollte nach bekannter Literaturvorschrift¹²³ ausgehend von *D*-Mannitol (**74**) erfolgen (Abbildung 97). Dieses sollte zunächst in das *Bis*-Acetal **75** umgewandelt werden, das dann mittels oxidativer Spaltung zunächst in den Aldehyd **76** überführt werden sollte. Dieser sollte nach Kiren *et al.*⁶⁴ durch eine Grignard-Addition in den sekundären Alkohol **77** umgewandelt werden, bei dem anschließend die freie Hydroxyfunktion unter basischen Bedingungen zu **78** methyliert werden sollte. Nach säurekatalysierter Acetalspaltung zum Diol **79** sollte dieses zum *Bis*-Silylether **80** derivatisiert werden. Nach selektiver Entschützung der primären Hydroxyfunktion zum Alkohol **81** sollte dieser in zwei Schritten zur Carbonsäure **83** oxidiert werden. Über eine Peptidkupplungsreaktion sollte dann das ethylgeschützte Glycinintermediat **84** dargestellt werden, das nach der Verseifung zur Säure **85** im letzten Schritt zum Thioester **45b** umgewandelt werden sollte.

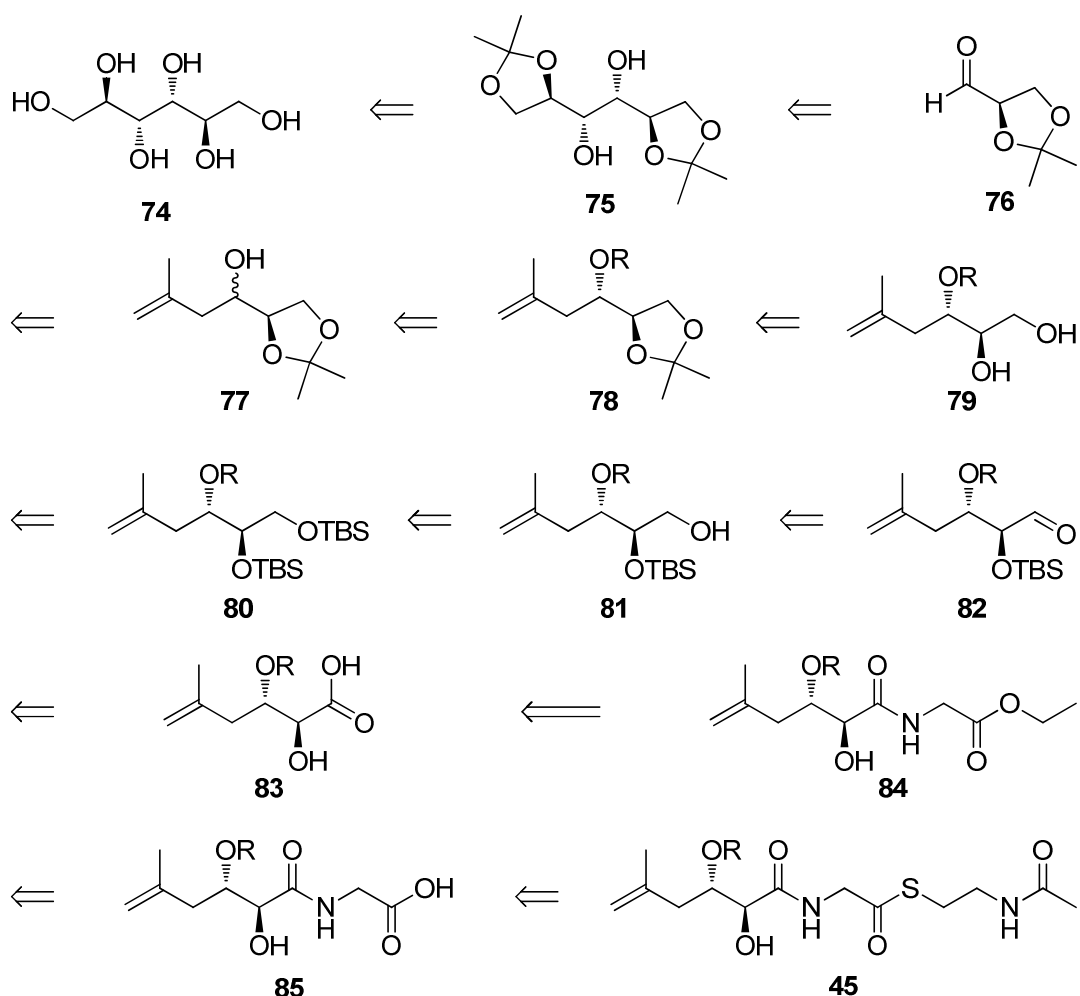


Abbildung 97: Retrosynthese der Testsubstrate 45a und 45b; R: a: -H oder b: -Me.

Das Intermediat **45a** sollte analog dargestellt werden. Bei dieser Syntheseroute sollte nach der Grignard-Addition intermediär eine Schutzgruppe eingeführt werden.

3.2.2.1 Synthese von S-(2-Acetamidoethyl)-2-((2S,3S)-2-hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-enamido)ethanthioat (45b)

Die ersten Syntheseschritte wurden nach der Vorschrift von Schmid *et al.* durchgeführt.¹²³ Ausgehend von *D*-Mannitol (**74**) wurde der Aldehyd **75** in zwei Schritten erhalten. Nach der Schützung als *Bis*-Acetal **76** mit einer Ausbeute von 54% wurde das vicinale Diol oxidativ in 50% Ausbeute zum Aldehyd **77** gespalten (Abbildung 98).

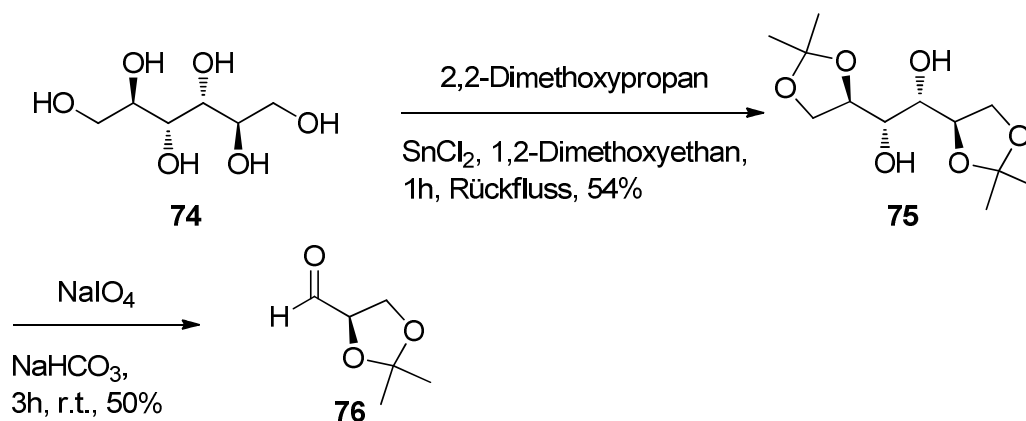
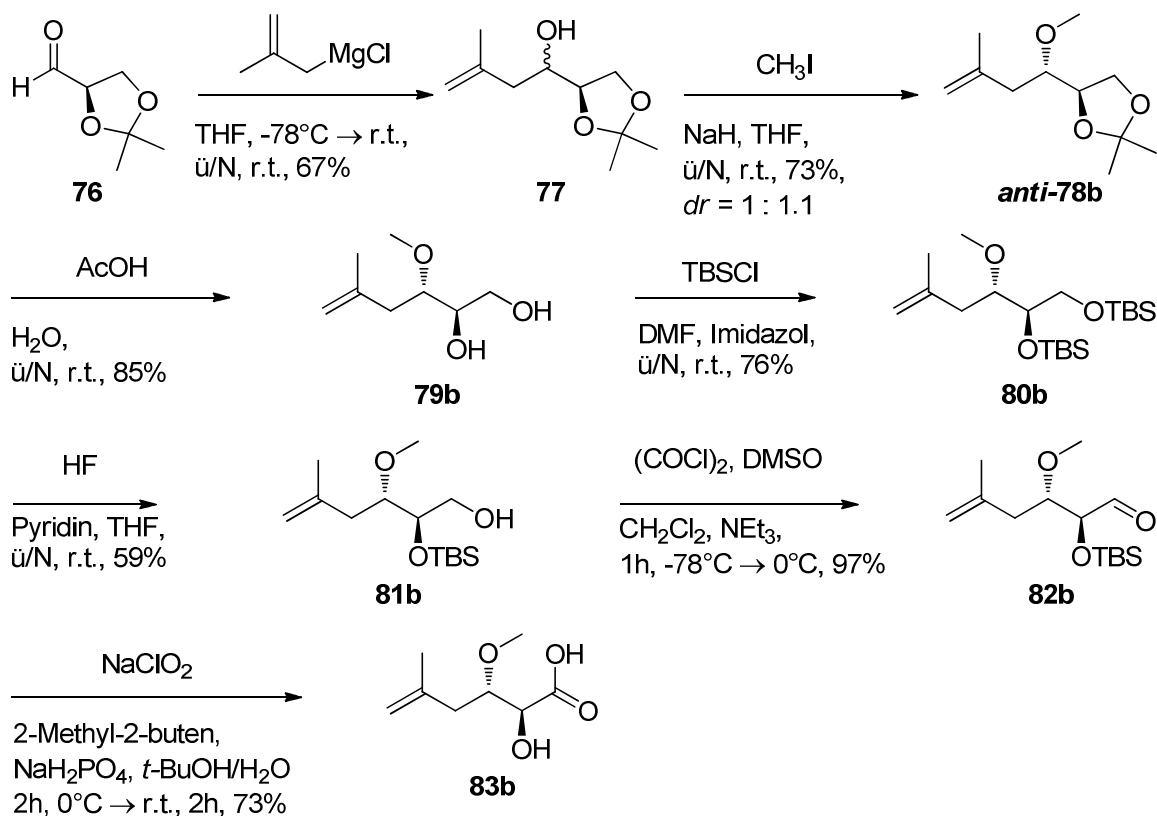
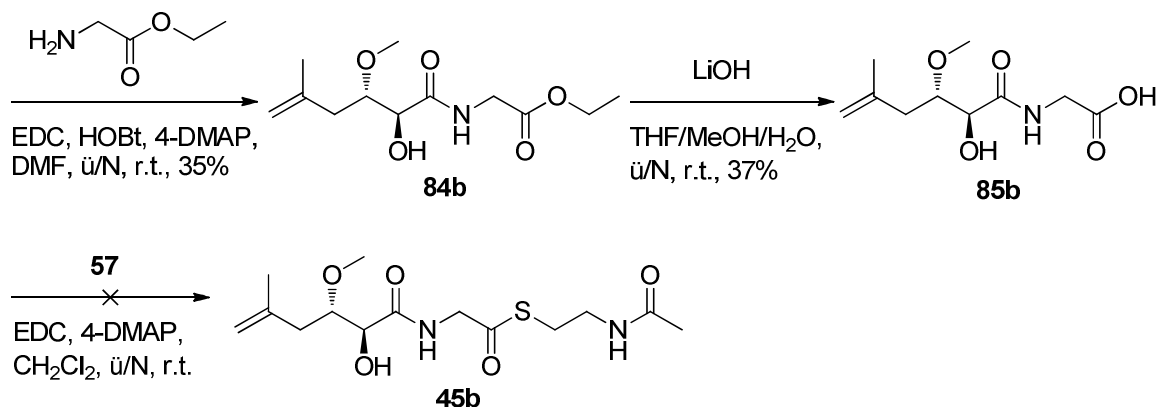


Abbildung 98: Darstellung des Aldehyds 76 über eine oxidative Spaltung des acetalgeschützten Mannitols 75.

Die weiteren Schritte wurden nach Kiren *et al.*⁶⁴ durchgeführt. Die Grignard-Addition des β -Methallylchlorids an den Aldehyd 76 ergab den sekundären Alkohol 77 in 67% Ausbeute als Diastereomerengemisch. Nach der basenkatalysierten Methylierung der Hydroxygruppe mit Iodmethan wurde das gewünschte *anti*-Produkt ***anti*-78b** in 41% Ausbeute erhalten. Nach der säurekatalysierten Acetalspaltung mit 85% Ausbeute wurde das Diol 79b als *Bis*-Silylether 80b mit 76% Ausbeute geschützt. Die selektive Entschützung der primären Hydroxygruppe ergab den Alkohol 81b in 80% Ausbeute. Aus der Kombination aus Swern- und Pinnick-Oxidation, was eine schonendere Variante als die Direktoxidation zur Carbonsäure darstellt, wurde die Säure 83b mit 73% Ausbeute erhalten (Abbildung 99).


 Abbildung 99: Darstellung der Säure **83b** nach Vorschrift von Kiren *et al.*⁶⁴

Die Glycineinheit wurde mittels Glycineithylester, EDC und 4-DMAP mit einer Ausbeute von 35% eingeführt. Der dabei entstehende Ester **84b** wurde mit Lithiumhydroxid in 37% Ausbeute zur Säure **85b** verseift.¹²⁴ Der Versuch scheiterte, **85b** mit *N*-Acetylcysteamin (**57**) zu kuppeln. Es wurde nur das Edukt reisoliert (Abbildung 100).


 Abbildung 100: Versuch der Darstellung des finalen Thioesters **45b** durch Kupplung mit Glycin, Entschützung des Ethylesters **85b** und anschließender Kupplung mit *N*-Acetylcysteamin (**57**).

Da der Reaktionsverlauf über die Kupplung der Säure **83b** scheiterte, wurde eine neue Syntheseroute zur Darstellung des Thioesters **45b** etabliert. Dafür wurde bei *N*-Boc-Glycin (**86**) zunächst die Säuregruppe mit *N*-Acetylcysteamin (**57**) zum Thioester **87** in 97% Ausbeute derivatisiert. Im Vergleich zu Wang *et al.* wurde die Ausbeute durch Zugabe von 4-DMAP um 36%, im Vergleich zu Oiry *et al.* sogar um bis zu 57% auf 97% gesteigert.^{125,126} Der Thioester **87** wurde dann säurekatalysiert zu **88** entschützt. Bei der bekannten Methode nach Oiry *et al.*¹²⁶ wurde mit HBr eine Ausbeute von 90% und mit TFA von 92% erzielt, bei der hier verwendeten Entschützung mittels HCl in 1,4-Dioxan eine Ausbeute von 96%. Das HCL-Salz **88** wurde dann mit der Säure **83b** zum finalen Thioester **45b** umgesetzt. Die Reaktion erfolgte mit einer Ausbeute von 26%. Vermutlich ist die freie Hydroxygruppe in α -Position störend (Abbildung 101).

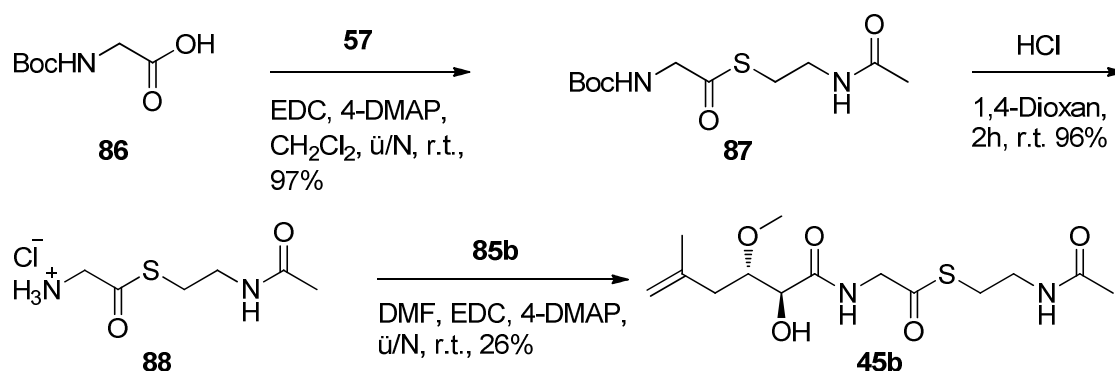


Abbildung 101: Darstellung des Testsubstrats 45b.

3.2.2.2 Synthese von *S*-(2-Acetamidoethyl)-2-((2*S*,3*S*)-2,3-dihydroxy-5-methylhex-5-enamido)ethanthioat (**45a**)

In der Psymberin-Biosynthese gibt es neben den beiden α -Hydroxylasen PsyC und PsyK auch eine *O*-Methyltransferase (*O*-MT). Da unklar ist, ob die Methylierung der Hydroxyfunktion in der Psymberin-Biosynthese vor oder nach der Hydroxylierung an der Glycineinheit passiert, sollte das zweite Testsubstrat **45a** ohne die Methoxygruppe synthetisiert werden (Abbildung 102).

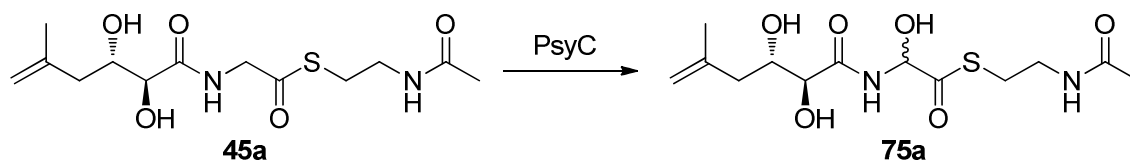


Abbildung 102: Putative Funktion von PsyC am nicht-methylierten Testsubstrat 45a.

Die ersten Schritte bei der Synthese des Testsubstrats **45a** waren identisch mit der des Testsubstrats **45b** (Abbildung 98). Anschließend wurde nach einem Weg gesucht, die Diastereomeren zu trennen, ohne die Methylgruppe einzufügen. Hierbei wurden verschiedene Schutzgruppen getestet. Mit der Acetyl- und Tetrahydropyranschutzgruppe¹²⁷ wurden negative Ergebnisse erzielt, erfolgsversprechend sah hingegen die PMB- (*para*-Methoxybenzyl-) Schutzgruppe aus.¹²⁸ Hiermit wurde eine ausreichende Trennung der Diastereomeren erzielt (Abbildung 103). Bei der Variante nach Horita *et al.*¹²⁹ wurden bei der Schützung der Hydroxyfunktion mit PMB schlechte Ausbeuten im Bereich von 33% erzielt, bei der Reaktionsführung nach Yoshino *et al.* moderate Ausbeuten im Bereich von 57%.¹²⁸ Der Unterschied der beiden Methoden lag in der Reihenfolge der Zugabe der Chemikalien. Durch die Zugabe von Natriumhydrid zur Reaktionsmischung wurde eine bessere Verteilung dessen erreicht und somit fanden weniger Nebenreaktionen durch die starke Base statt.

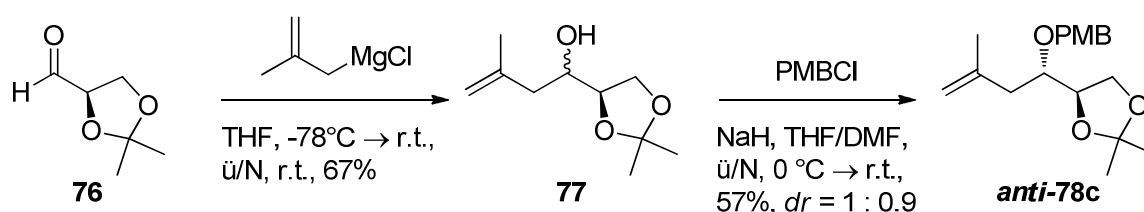


Abbildung 103: Trennung der Diastereomere nach der PMB-Schützung des Alkohols 80c.

Die absolute Konfiguration von **anti-78c** wurde mittels 2D-¹H-Kernresonanzspektroskopie (NMR) bestimmt. Durch NOESY-Experimente (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) wurde das *anti*-Diastereomer der beiden getrennten Fraktionen ermittelt. Nach Trennung der Diastereomeren wurde das Reaktionsschema von Kapitel 3.2.2.1 verfolgt (Abbildung 104). Es folgte eine Entschützung der Acetalschutzgruppe zum Diol **79c** mit einer Ausbeute von 86% und eine TBS-Schützung der freien Hydroxygruppen zum Intermediat **80c** in 74% Ausbeute. Die primäre TBS-Schutzgruppe wurde mit 53%

Ausbeute selektiv zum Alkohol **81c** entschützt und dieser in zwei Schritten zur Säure **83c** oxidiert. Neben der Swern-Oxidation wurde hier auch die Dess-Martin-Oxidation zum Aldehyd **82c** versucht. Diese lieferte mit 95% Ausbeute um 2% bessere Ausbeuten als die Swern-Oxidation. Die Ausbeute der Pinnick-Oxidation lag bei 67%.

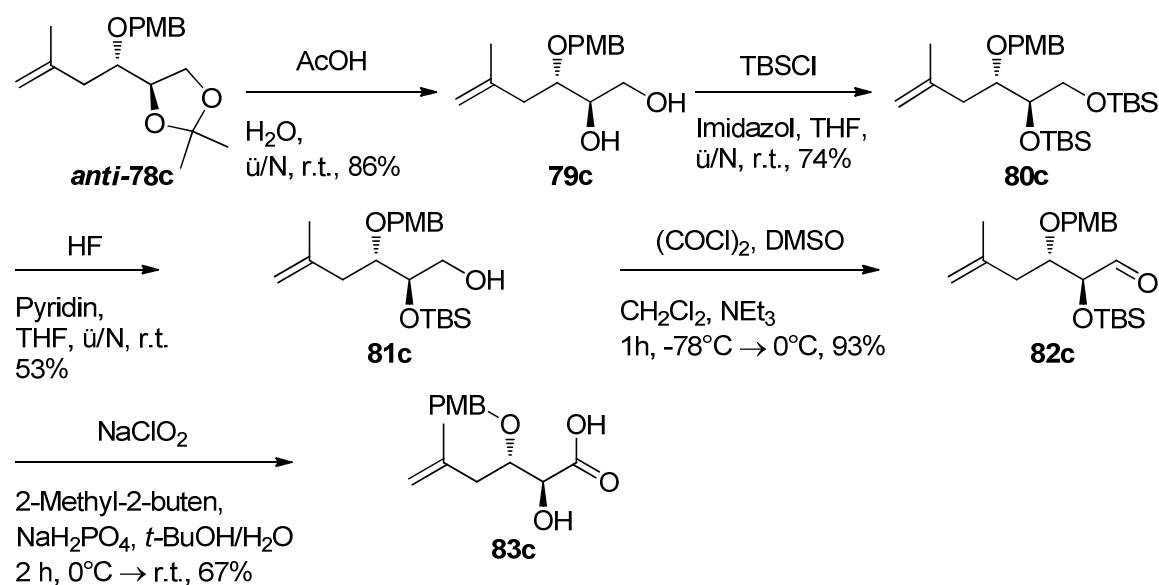


Abbildung 104: Darstellung der PMB-geschützten Säure **83c**.

Die Darstellung des Thioesters **45c** gelang mit der Standardmethode über EDC und 4-DMAP. Die Peptidkupplung wurde mit dem dargestellten Glycin-Thioester **88** mit einer Ausbeute von 26% (Abbildung 105) erzielt. Eine Entschützung des PMB-geschützten Intermediats wurde im ersten Ansatz mit TFA versucht, leider erwies sich dieses Reagenz aber als zu schwach. Es wurde nur das Edukt **45c** reisoliert.¹³⁰ In einem zweiten Ansatz wurde die Entschützung mit DDQ nach Horita *et al.*^{129,131} versucht. Auch hier konnte keine Entschützung des geschützten Intermediates **45c** erzielt werden, es erfolgte vermutlich eine Nebenreaktion mit DDQ, das ein starkes Oxidationsmittel ist. Auch das Edukt **45c** konnte nicht reisoliert werden.

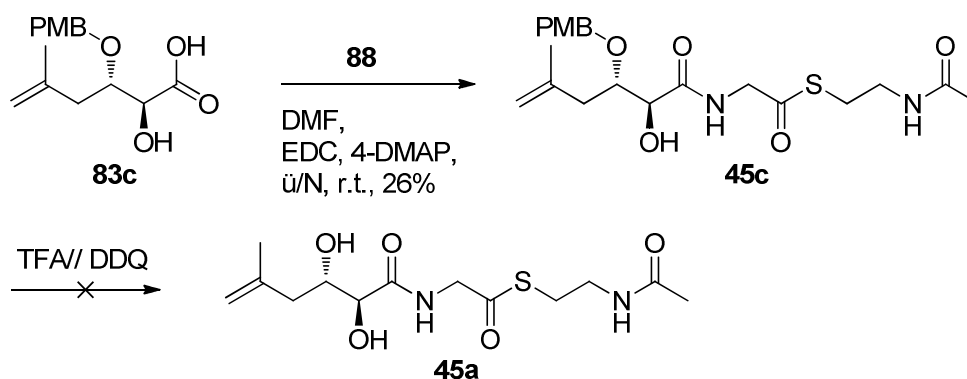


Abbildung 105: Darstellung des Thioesters **45c** mittels EDC/4-DMAP und versuchte Entschützung zu **45a**.

Parallel wurde ebenfalls versucht, das Testsubstrat **45a** über den Einsatz der TBS-Schutzgruppe darzustellen. Hierbei wurde keine Diastereomerentrennung erzielt, doch am Ende wurde diese über präparative HPLC geplant (Abbildung 106). Es folgte die bekannte Reaktionssequenz, bei der zuerst die Acetalgruppe in 72% Ausbeute entschützt wurde. Anschließend wurde die primäre Hydroxyfunktion selektiv mittels HF mit einer Ausbeute von 55% zum Substrat **81d** entschützt, und dieses wurde anschließend über den Aldehyd **82d** mit einer Ausbeute von 97% und zuletzt zur Carbonsäure **83d** in 53% Ausbeute oxidiert.

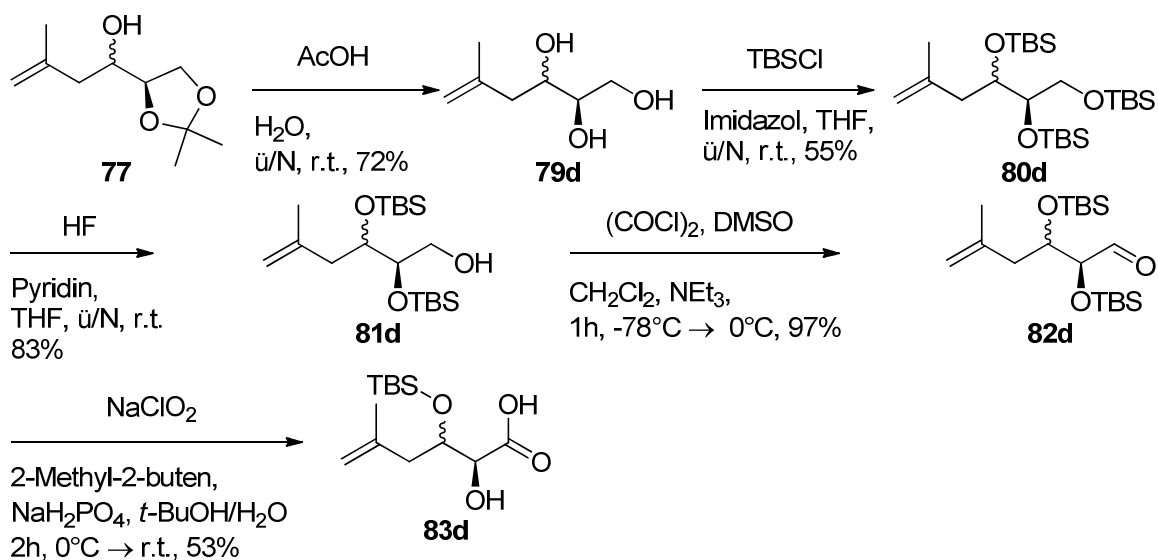


Abbildung 106: Darstellung der Säure **83d**.

Eine Kupplung der Säure **83d** mit dem Glycin-Thioester **88** scheiterte (Abbildung 107). Vermutlich schirmt die große TBS-Schutzgruppe das Molekül zu sehr ab.

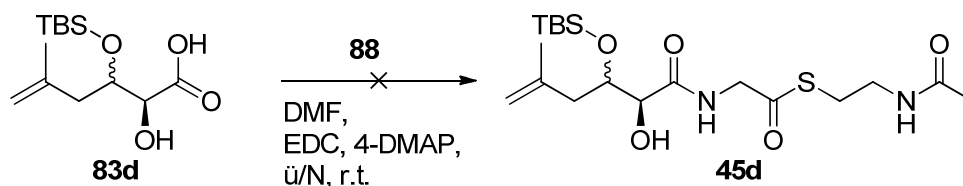


Abbildung 107: Versuchte Kupplung der Säure **83d** mit Glycin-Thioester **88**.

Hier empfiehlt sich die Darstellung des Testsubstrats **45a** über eine gänzlich andere Syntheseroute, in der das stereochemische Motiv direkt zu Anfang über eine stereospezifische Reaktion eingeführt wird. Für eine neue Synthesestrategie fehlte leider die Zeit.

3.2.3 Stabilitätstest der Proteine PsyD(*O*-MT) und PsyC

Die Isolierung der Domänen sowie die Überexpression der Proteine für die Enzymassays PsyD(*O*-MT), PsyC sowie PsyK wurde bereits von Dr. Holger Niederkrüger durchgeführt.⁷² Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit den Proteinen PsyD(*O*-MT) und PsyC ein Puffertest durchgeführt, mit Hilfe dessen bestimmt werden sollte, in welchem Puffer die Enzyme die größte Stabilität aufweisen. Dieser Puffer sollte dann später zur Durchführung der Assays verwendet werden (siehe Abschnitt 4.2.9.4).

Das SDS-Gel für PsyD(*O*-MT) zeigte eine Bande bei der erwarteten Größe von 39.7 kDa (Abbildung 108). Der Puffertest ergab für alle verwendeten Puffer eine sehr gute Überproduktion. Die breiteste Bande war für den Puffer HEPES, 0.05 M bei einem pH-Wert von 7.5 zu sehen. Daraus lässt sich schließen, dass dieser Puffer für die größte Stabilität des Proteins sorgt.

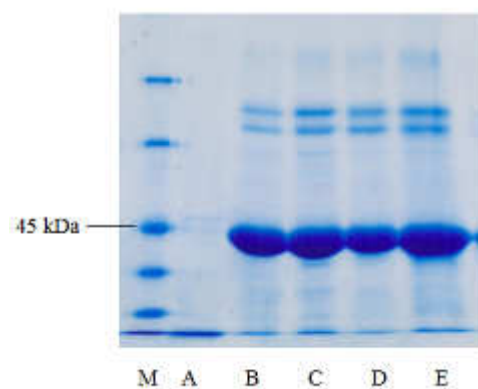


Abbildung 108: Puffertest mit PsyD(O-MT); M: Marker, A: MOPS-Puffer, 0.1 M, pH 7.0, B: Tris/HCl-Puffer, 10% Gly, 0.1 M, pH 8.5, C: Kpi-Puffer, 0.1 M, pH 7.0, D: HEPES-Puffer, 0.05 M, pH 7.0, E: HEPES-Puffer, 0.05 M, pH 7.5.

Das SDS-Gel für PsyC zeigte eine Bande bei der erwarteten Größe von 53.0 kDa (Abbildung 109). Es wurde insgesamt weniger Protein als bei PsyD(O-MT) produziert. Die breiteste Bande wurde ebenfalls mit 0.05 M HEPES-Puffer pH 7.5 erzielt.

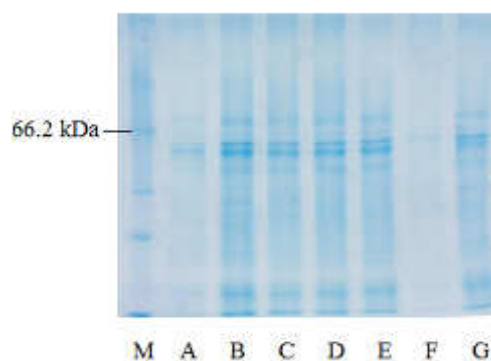
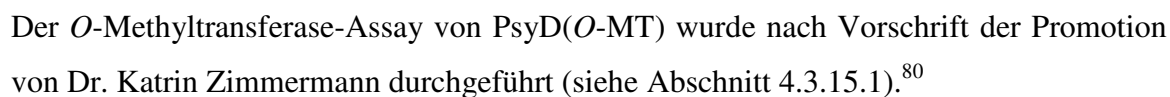


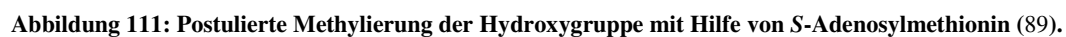
Abbildung 109: Puffertest von PsyC; M: Marker, A: HEPES-Puffer, 0.05 M, pH 7.0, B: HEPES-Puffer, 0.05 M, pH 7.5, C: MOPS-Puffer, 0.1 M, pH 7.0, D: Tris/HCl-Puffer, 10% Gly, 0.1 M, pH 8.5, E: Tris/HCl-Puffer, 10% Gly, 0.1 M, pH 7.5, F: Kpi-Puffer, 0.1 M, pH 8.0, G: Kpi-Puffer, 0.1 M, pH 7.0.

Das Protein PsyC wurde zur besseren Überproduktion an den SUMOI- (Small Ubiquitin-like Modifier) Tag gebunden.¹³² Dieser verändert die Proteinstruktur und Proteinfunktion, indem er kovalent an die Lysin-Seitenketten des Zielmoleküls bindet (siehe Abschnitt 4.2.13.5). Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, das Enzym mittels der SUMOI-Protease vom SUMO-Tag zu spalten. Es wurde bei der Auswertung jedoch keine Änderung der Größe des Proteins beobachtet. Der SUMO-Tag ließ sich trotz optimaler Salzkonzentration, Temperatur und pH-Wert nicht abspalten.

Als Testsubstrat diente der dargestellte SNAC-Thioester **44a**, erwartet wurde das methylierte Produkt **44b** (Abbildung 110).



S-Adenosylmethionin (SAM) (**89**) wird hierbei als Überträger der Methylgruppe eingesetzt. Es ist ein Sulfoniumsalz mit hoher Methylübertragungstendenz, das auch von Methyltransferasen der Pederin-Biosynthese als Cofaktor verwendet wird (Abbildung 111).⁸¹



Nach Durchführung der Proteinassays war in den Massenspektren sowohl bei der Negativkontrolle als auch bei den Proben mit Protein nur das Testsubstrat detektierbar. Selbst bei einer unvollständigen Umsetzung würde man bei den Proben zusätzlich ein Signal des methylierten Produktes bei $m/z = 282.1$ $[M+Na]^+$ erwarten, dieses war jedoch nicht zu sehen. Zur Verbesserung des Assays wurde nach Sherman *et al.* Magnesiumchlorid zugegeben, da eine Abhängigkeit von einem Metall-Cofaktor bei dieser Klasse von Enzymen nicht unüblich ist.¹³³ Weitere Messungen wurden per LC/MS durchgeführt (Abbildung 112). Auch hier war in allen Proben nur das eingesetzte Substrat detektierbar.

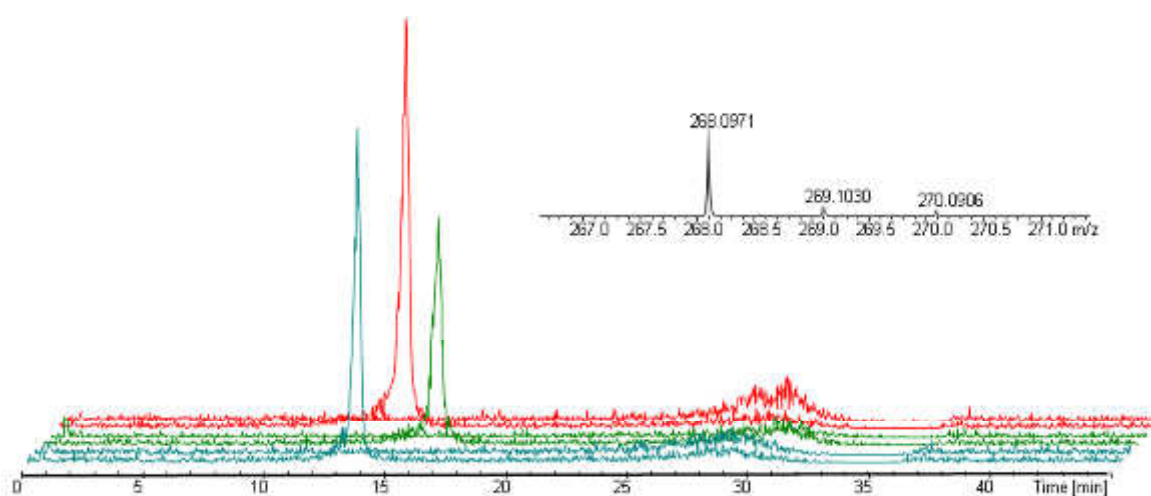


Abbildung 112: LC-ESI-microQ-TOF-MS des PsyD(*O*-MT) Enzymassays mit aufgereinigtem Protein; rot: PsyD-1, Negativkontrolle, 100 μ L Substrat; grün: PsyD-2, 200 μ L Proteinlösung, 100 μ L Substrat; blau: PsyD-3, 600 μ L Proteinlösung, 200 μ L Substrat; Proteinlösung 129 μ g/mL; Substratlösung 200 mM.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass das erwartete Produkt des Assays, der methylierte Thioester **44b**, mittels massenanalytischen Verfahren nicht detektierbar ist, wurde der Standard **44b** synthetisiert (siehe Abschnitt 3.2.1). Dieser war in den gemessenen ESI-Spektren detektierbar. Weitere Analytik wurde per HPLC vorgenommen. Die Identifikation des erwarteten Produkts sollte mit Hilfe des Standards **44b**, der ebenfalls auf der HPLC vermessen wurde, erfolgen. (Abbildung 113). Die Konzentration des Testsubstrats wurde aufgrund der besseren Detektierbarkeit durch die HPLC auf 10 mM erhöht.

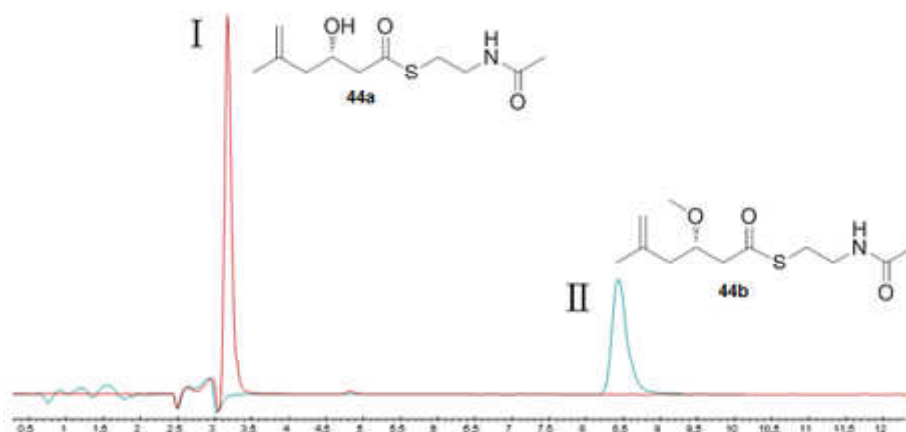


Abbildung 113: HPLC-Spektrum des Testsubstrats 44a (I) und des Teststandards 44b (II); Laufbedingungen: ACN/H₂O 30/70.

Da in diesen Messungen ebenfalls kein Produkt detektierbar war, wurde die Möglichkeit erwogen, dass SNAC-Thioester schlechte Substrate für die Methyltransferase PsyD(*O*-MT) sein könnten und statt dessen ACP-gebundene Substrate nötig sind. Aus diesem Grund wurde versucht, das Testsubstrat **44a** an das kognate ACP1 zu binden um weitere Untersuchungen mit dem ACP-gebundenen Substrat vorzunehmen (Abbildung 114).

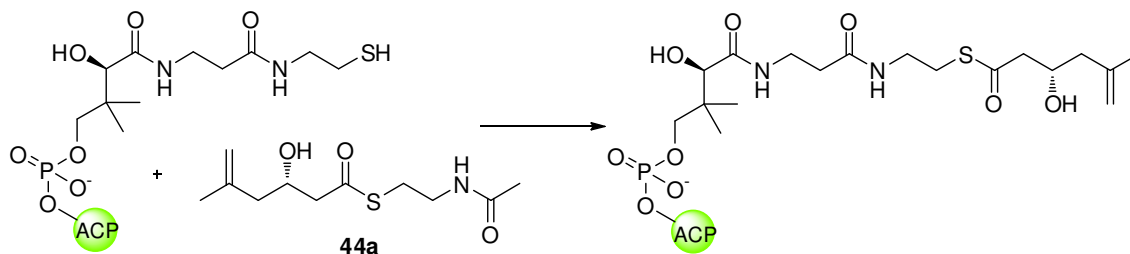


Abbildung 114: Bildung des Acyl-ACP.

Das *holo*-PsyD-ACP1 wurde bereits von Dr. Holger Niederkrüger überexprimiert.⁷² Die versuchte Acylierung des Proteins erfolgte über eine Inkubation des Testsubstrats **44a** für eine Stunde mit der umgepufferten *holo*-PsyD-ACP1 Lösung bei 30 °C.¹³⁴ Anschließend wurde der Assay durchgeführt. Danach wurde das Acyl-ACP durch Zugabe von Hydrazin zum Intermediat **91** gespalten (Abbildung 115).

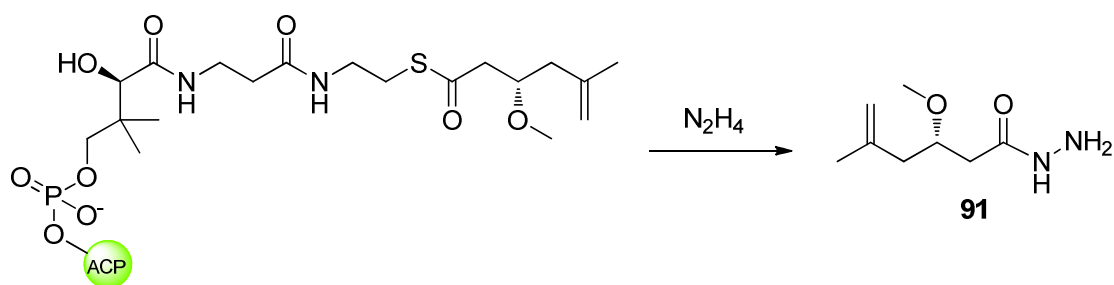


Abbildung 115: Spaltung der Acyl-ACP-Bindung mittels Hydrazin.

Die Proben wurden zwei Mal mit EtOAc extrahiert und sowohl über ESI Massenspektrometrie als auch über LC/MS vermessen. Die Signale des Testsubstrats **44a** waren erneut in allen Proben gut detektierbar, jedoch waren keine klaren Signale für das erwartete umgesetzte Produkt **91** zu erkennen.

Auch die massenspektrometrische Untersuchung des Acyl-PsyD-ACP1 war nicht erfolgreich. Die detektierte Masse des Proteins lag bei 10.962 Da, was sich um 1044 Da von der exakten berechneten Masse von 12.007 Da für die *holo*-Form des Proteins unterschied und selbst für die *apo*-Form des Proteins, die eine Größe von 11.674 Da hat, noch zu klein ist.⁷² Vielleicht ist das Protein sensitiv gegenüber *E. coli* eigenen Proteasen und wird von diesen teilweise abgebaut.

Weitere Untersuchungen mit dem ACP sowie Versuche mit ACP-gebundenem Protein scheinen vielversprechend, da die native Reaktion, durch die Modul-integrierte Lokalisation der PsyD(*O*-MT), an einem ACP-gebundenen Intermediat des Psymberins stattfinden sollte.¹³⁵

3.2.4.2 Assays der putativen α -Hydroxylasen PsyC und PsyK

Dr. Holger Niederkrüger hat nachgewiesen, dass PsyC Eisen enthält.⁷² Zusammen mit den PSI-BLAST- (Position-specific Iterated-Basic Local Alignment Search) Ergebnissen deutet das darauf hin, dass es sich um eine Fe/ α -Ketoglutarat-abhängige Oxidoreduktase handelt. Homologie zu diesem Protein existieren in der Biosynthese von Pederin **28** (PedK)⁸⁰ und Onnamid A **29** (OnnE und OnnF) (Abbildung 116).

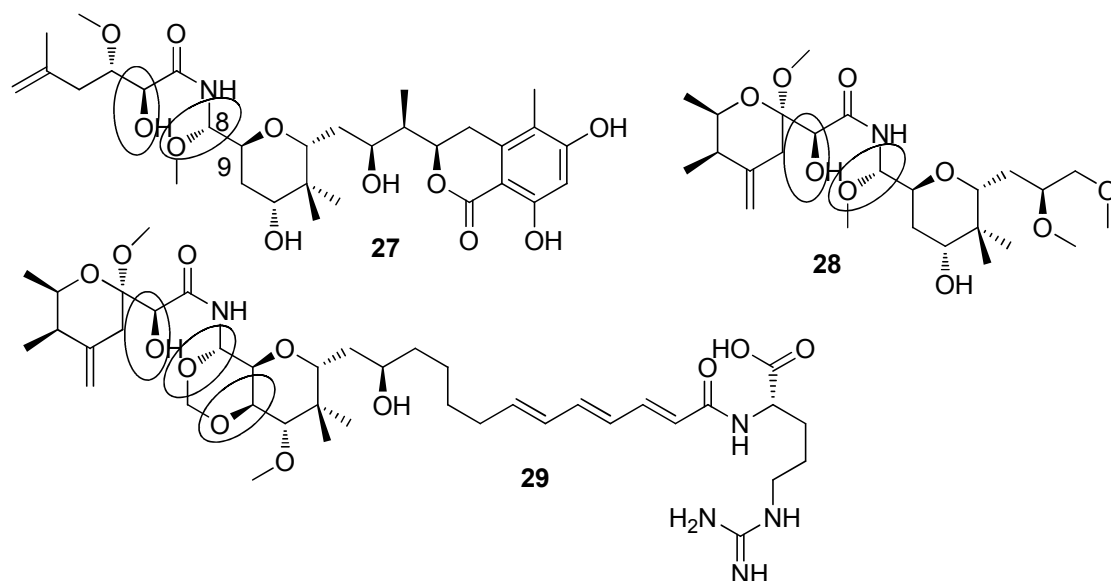


Abbildung 116: α -hydroxylierte Polyketide der Pederinfamilie.

Bei PSI-BLAST Untersuchungen wird zunächst eine Liste aller ähnlichen Proteine erstellt, woraus eine sogenannte Profilsequenz erstellt wird, die die konservierten Regionen der Proteine zusammenfasst. Mit dieser Profilsequenz wird wieder eine BLAST-Suche durchgeführt. Dieser Prozess wird wiederholt. Dadurch, dass verwandte Proteine in die Suche miteinbezogen werden, ist PSI-BLAST viel empfindlicher bei der Ermittlung weit entfernter Verwandtschaften als das gewöhnliche BLAST.¹³⁶

Fe/ α -Ketoglutaratabhängige Oxidoreduktasen arbeiten mit Eisen(II), an das zwei Histidine sowie das α -Ketoglutarat (**92**) gebunden sind.¹³⁷ Das Eisen(II)-bindende Aminosäuremotiv ist in diesem Fall His¹-X-Asp/Glu-X_n-His². Eine zweite charakteristische Aminosäure (Arg/Lys) ist elf bis zwölf Aminosäuren weiter von His² lokalisiert und übernimmt die Stabilisierung des α -Ketoglutarats an C-5 (Abbildung 117-118).^{73,138}

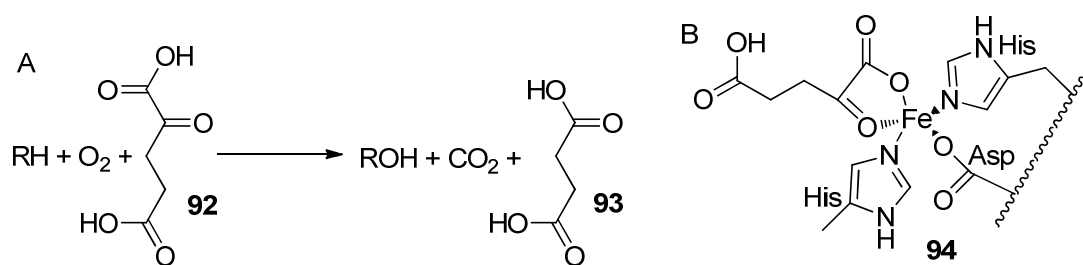


Abbildung 117: Katalysierte Reaktionen von Fe(II)/α-Ketoglutaratabhängigen Oxygenasen. A: Das Substrat wird hydroxyliert und α-Ketoglutarat (92) zu Succinat (93) decarboxyliert. B: Aktives Zentrum von Fe(II)/α-Ketoglutaratabhängigen Oxygenasen: Fe(II) wird von α-Ketoglutarat (92) und einer katalytischen Triade aus Aspartat und zwei Histidinen (94) chelatisiert.⁷³

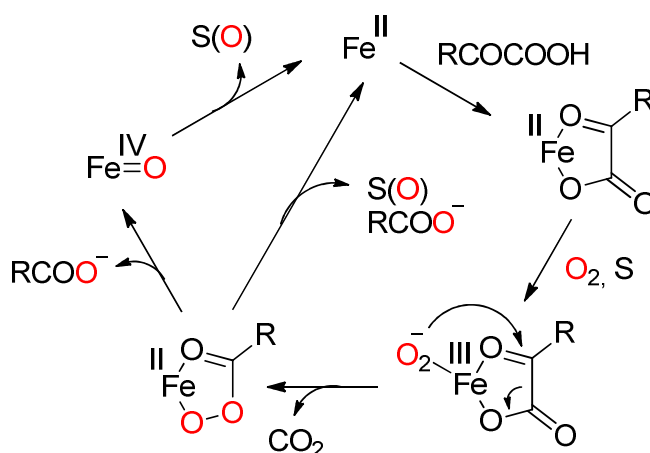


Abbildung 118: Reaktionsmechanismus von α-Ketoglutaratabhängigen Oxygenasen, Zuerst ligiert das α-Ketoglutarat an das Eisen(II), Sauerstoff lagert sich an, es entsteht ein Eisen(III) Superoxid. Durch Angriff eines Sauerstoffatoms wird das α-Ketoglutarat decarboxyliert, es entsteht ein Eisen(II)-Peroxid. Dieses kann entweder direkt oder über ein hochvalentes Eisen(IV)-Oxo-Intermediat mit dem Substrat reagieren.¹³⁹

Es gibt zwei *post*-PKS-Oxidationen im Psymberin (**27**): die Hydroxylierung im westlichen Teil neben der Methoxyfunktion und die Hydroxylierung des Glycinbausteins. Im Nosperin gibt es zwar die erste Hydroxylierung, aber nicht die des Glycins, und der Cluster enthält kein PsyC-Homologes.⁷⁵ Aus diesem Grund ist PsyC wahrscheinlich die Glycin-Hydroxylase und PsyK die Hydroxylase für den Westarm.

Um diese Funktion zu überprüfen, wurde PsyC heterolog exprimiert, aufgereinigt und in *in vitro*-Assays zunächst mit dem im Rahmen der Promotion von Dr. Christoph Kohlhaas synthetisierten Intermediat **95** umgesetzt. Dieses Intermediat stellt ein vereinfachtes Analogon zum putativen Substrat **45b** dar (Abbildung 119).

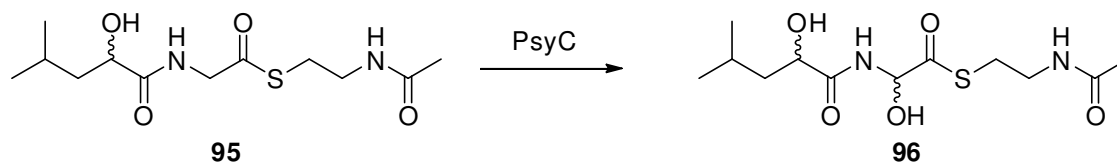


Abbildung 119: Im Rahmen der Doktorarbeit von Christoph Kohlhaas synthetisiertes Intermediat **95** zum Test an PsyC.

Da die Auswertung des Assays per LC/MS erfolgen sollte, wurde zunächst die Retentionszeit des Thioesters **95** per HPLC bestimmt (Abbildung 120).

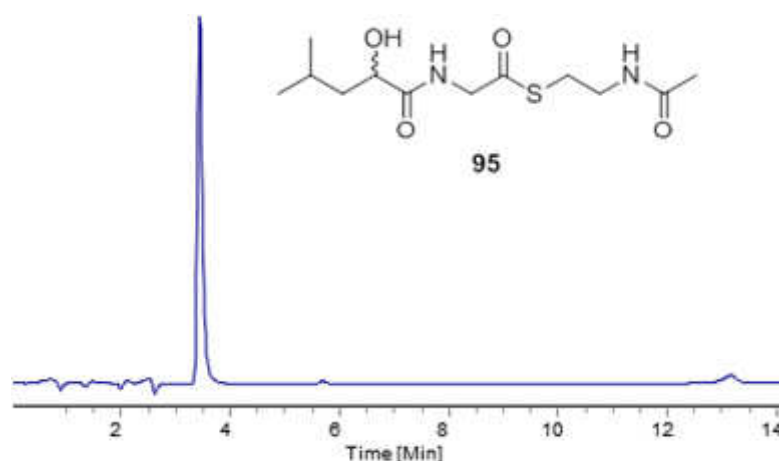


Abbildung 120: HPLC-Lauf des Thioesters **95**; Laufbedingungen: ACN/H₂O 30/70.

Der Assay für PsyC wurde nach Yin *et al.* durchgeführt (siehe Abschnitt 4.2.15.2).¹⁴⁰ Dieser untersuchte VioC aus dem Viomycin-Gencluster. VioC ist ebenfalls eine Fe/ α -Ketoglutarat-abhängige Oxygenase und für eine α -Hydroxylierung von *L*-Arginin innerhalb des Viomycin-Biosyntheseweges verantwortlich. Aufgrund dieser Ähnlichkeit wurde der Assay unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen vorgenommen.

Das bei der Umsetzung mit PsyC entstehende Halbaminal **97** ist vermutlich wenig stabil und zerfällt zum Amid **98** und Aldehyd **99** (Abbildung 121).

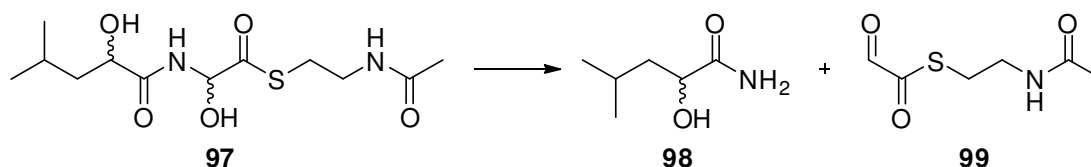


Abbildung 121: Zerfall des Halbaminals **97** zum Amid **98** und Aldehyd **99**.

Unter den gleichen Bedingungen wie für Thioester **95** wurde auch das putativ in der Biosynthese akzeptierte Testsubstrat **45b** im Enzymassay umgesetzt (Abbildung 122).

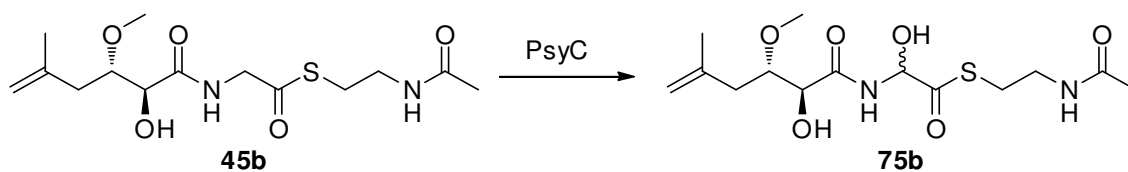


Abbildung 122: vermutete Umsetzung von 45b mit PsyC.

Hier wurde ebenfalls eine HPLC-Analyse vorgenommen um die Retentionszeit des Moleküls **45b** zu bestimmen (Abbildung 123).

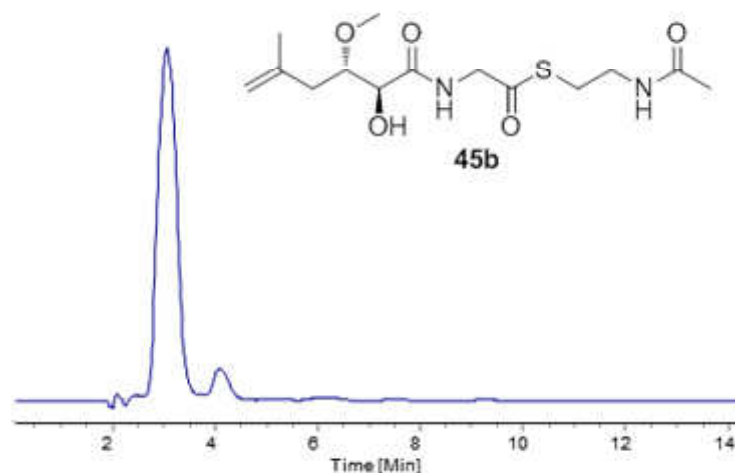


Abbildung 123: HPLC-Lauf von 45b, Laufbedingungen: ACN/H₂O, 30/70.

Auch dieses Intermediat wird vermutlich nach der Einführung der Hydroxygruppe zum Amin **100** und Aldehyd **101** zerfallen (Abbildung 124).

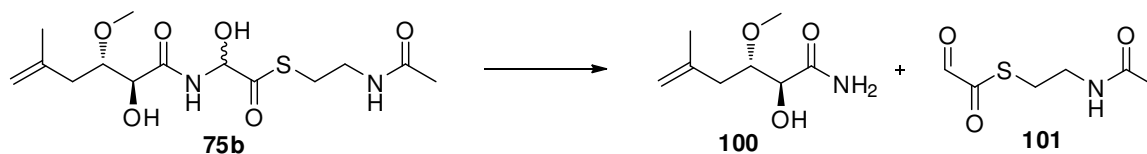


Abbildung 124: Zerfall des Halbacetals 75b zum Amid 100 und Aldehyd 101.

Es ist ebenfalls möglich, dass PsyC erst am Ende der Biosynthese agiert und die Hydroxyfunktion einführt. Aus diesem Grund wurde Desmethoxypsymberin **102**, das im Rahmen der Promotion von Max Bielitz synthetisiert wurde, als weiteres Testsubstrat im Assay eingesetzt (Abbildung 125).⁶³

Als Laufbedingungen für das Desmethoxypsymberin (**102**) wurden die des Psymberins (**26**) verwendet (0 - 100 ACN/H₂O, 0.1% Ameisensäure).

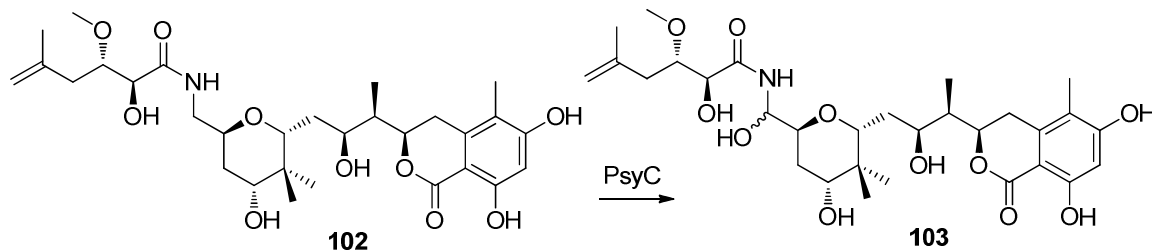


Abbildung 125: Umsetzung von PsyC mit Desmethoxypsymberin **102**.

Hier wird bei erfolgter Hydroxylierung vermutlich ebenfalls ein Zerfall des *N,O*-Halbaminals eintreten (Abbildung 126).

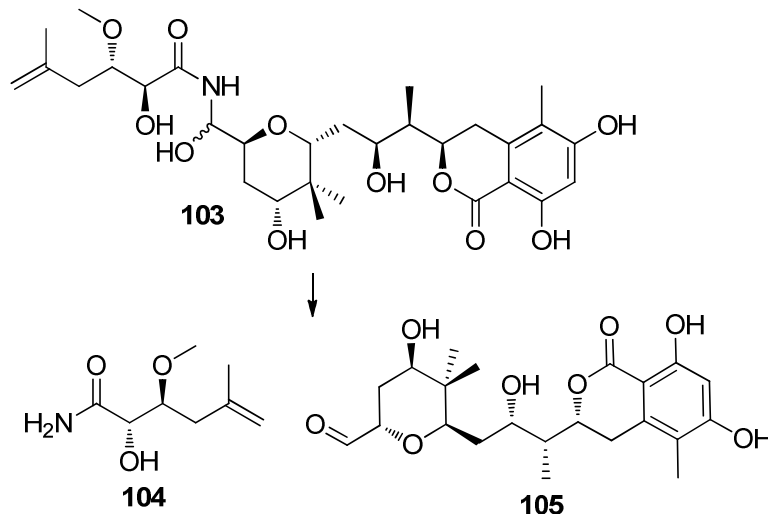


Abbildung 126: Zerfall des Halbaminals **103** zum Aldehyden **104** und Amid **105**.

Die LC/MS-Messungen der Assays für die untersuchten Testsubstrate **97**, **45b** sowie **102** erwiesen sich als negativ. In keiner der Proben wurde ein Signal für die Produkte des Assays detektiert, wobei für jedes der Substrate ein Signal zu sehen war. Aus diesem Grund wurden die Assaybedingungen variiert. Der Assay wurde nach Flashman *et al.*

durchgeführt, die eine ebenfalls Eisen(II)- und Oxoglutarat-abhängige Oxygenase untersuchten.¹⁴¹ Diese verwendeten einen größeren Anteil Ascorbat im Assay (siehe Abschnitt 4.3.15.3). Auch hier gelang es nicht, die erwarteten Produkte zu detektieren.

Es ist möglich, dass aufgrund der nicht geklärten Reihenfolge der Umsetzungen in der Biosynthese das Testsubstrat **45b** aufgrund der Methylierung der Hydroxyfunktion nicht das passende Substrat für das Enzym ist. Da es im Rahmen dieser Arbeit nicht gelang, Testsubstrat **45a** zu synthetisieren, konnte der Assay an diesem Substrat nicht getestet werden.

Ebenfalls ist es möglich, dass PsyC keine *N*-Acetylcysteamin-Thioester akzeptiert. Daher sollten weitere Versuche mit CoA-Estern oder ACP-gebundenen Substraten unternommen werden.

Die zweite α -Hydroxylase im Psymberin-Biosyntheseweg ist die FAD-abhängige Oxidoreduktase PsyK, die PedJ aus dem Pederin-Biosyntheseweg und OnnC aus dem Onnamid-Biosyntheseweg ähnelt. Da unklar ist, ob die *O*-Methyltransferase oder die Oxygenase zuerst agiert, wurden sowohl Testsubstrat **44a** als auch Testsubstrat **44b** für den Assay eingesetzt (Abbildung 127).

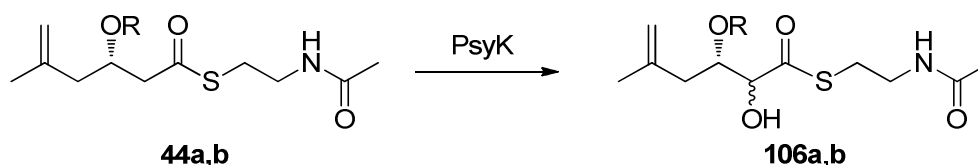


Abbildung 127: Putative Umwandlung der Testsubstrate 44a und 44b im PsyK-Assay; R= -Me, -H.

Als Vorbild für den PsyK-Assay wurde der Assay eines ähnlichen Enzyms aus der Arbeit von S. G. Van Lanen *et al.*¹⁴² gewählt und modifiziert. Dieser untersuchte das FAD-abhängige Enzym SgcE6, das vermutlich für eine Hydroxylierung im Biosyntheseweg des Endiin-Antibiotikums C-1027 verantwortlich ist. C-1027 wird ebenfalls von einer Typ I-PKS produziert, was auf eine biochemische Ähnlichkeit zwischen den beiden Oxygenasen hoffen ließ.¹⁴³ Da keine Angaben zur Menge des Substrats vorhanden waren, wurde die doppelte Gewichtsmenge des Proteins eingesetzt. Die Konzentration des NADPH/FAD wurde halbiert, da bei der in der Vorschrift angegebenen hohen Konzentration keine Messung möglich war (siehe Abschnitt 4.3.15.3).

NADPH (**107**) dient hierbei als Elektronenüberträger. Es reduziert FAD (**109**) zu FADH₂ (**110**) und wird während der Reaktion zu NADP⁺ (**108**) oxidiert (Abbildung 128-129).

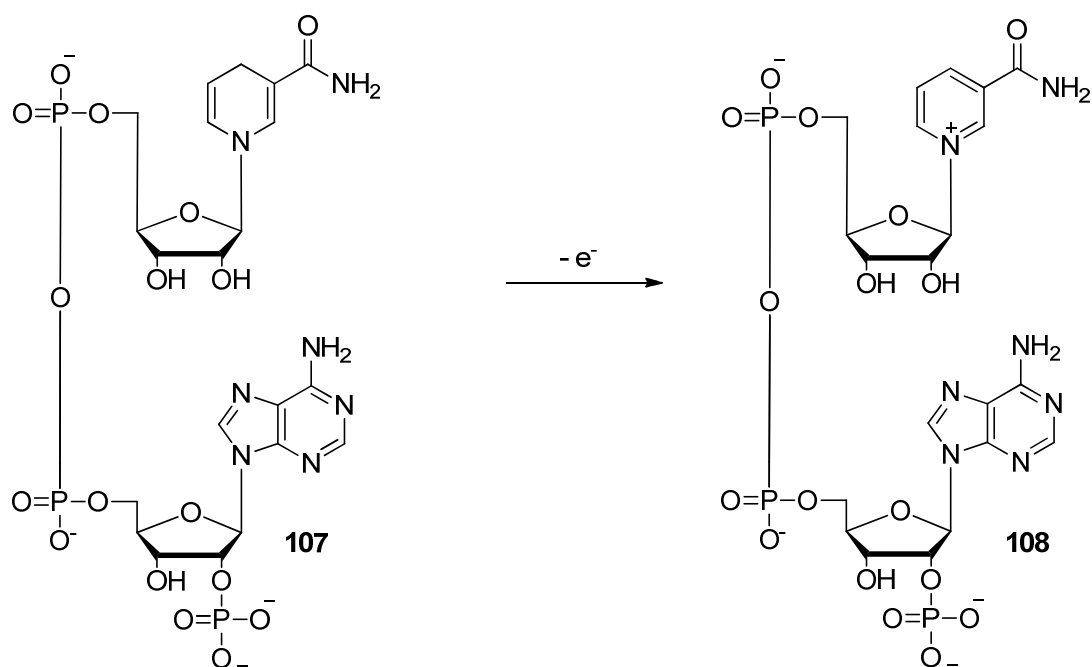


Abbildung 128: Oxidation des NADPH (**107**) während des Assays.

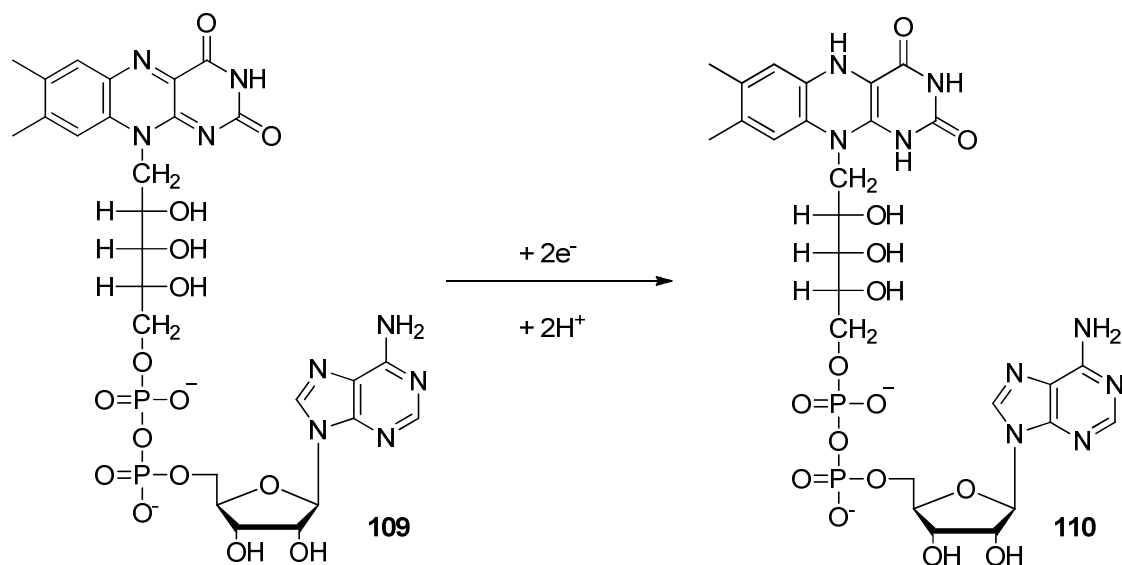


Abbildung 129: Reduktion des FAD (**109**) während des Assays.

Das reduzierte FADH₂ (**110**) ist vermutlich in der Lage, Luftsauerstoff als Hydroperoxid **111** zu binden, das an der Hydroxylierung der Intermediate **44a,b** beteiligt ist (Abbildung 130).

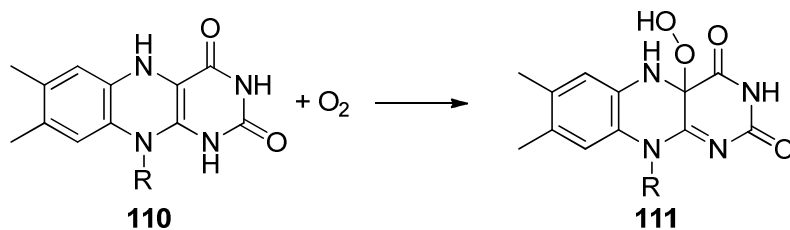


Abbildung 130: Bildung des Hydroperoxids während des Assays.

Das Hydroperoxid oxidiert dann vermutlich das Substrat zum α -hydroxylierten Intermediat **106a,b** (Abbildung 131).

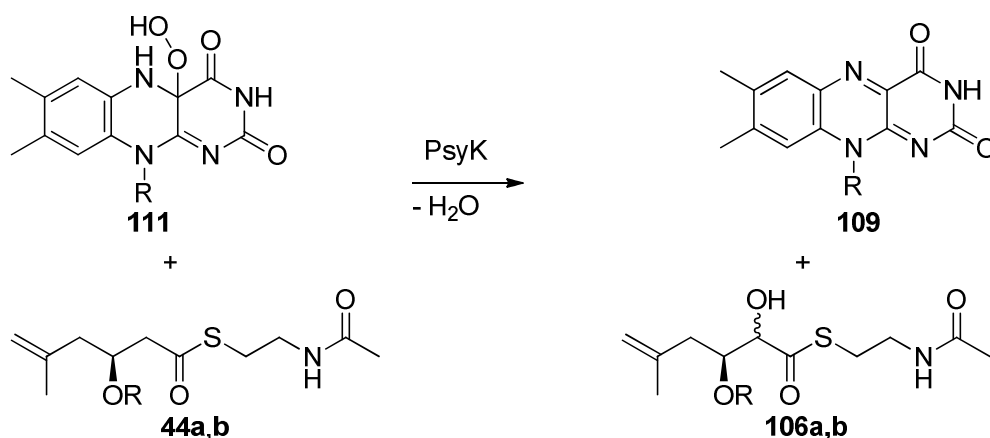


Abbildung 131: Erwartetes Produkt bei der Umsetzung von 44a,b mit PsyK; R= -Me, -H.

Es gab bei keinem der Testsubstrate eine Veränderung der Absorption bei 340 nm, also kann davon ausgegangen werden, dass PsyK keine Umsetzung an den Testsubstraten **44a,b** bewirkt hat. Auch hier könnte die Anwendung von CoA-Estern oder ACP-gebundenen Substraten erfolgversprechend sein.

3.3 Untersuchungen der putativen PS-Domäne aus der Pederin-PKS

Fünf- oder Sechsringe sind ein wichtiges strukturelles Merkmal in vielen bioaktiven Naturstoffen, die von PKS produziert werden. In vielen dieser PKS existiert eine Domäne, die Ähnlichkeit mit der DH aufweist, sie enthält jedoch von dieser abweichende Motive am aktiven Zentrum. Es wurde vermutet, dass diese Domänen, sogenannte PS-Domänen (siehe Abschnitt 1.1.2), für den Ringschluss verantwortlich sind.¹⁴⁴ Um diese Funktion zu verifizieren, wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Petra Pöplau die

PS-Domäne aus dem Pederin-Gencluster überexprimiert. In dem darauffolgenden Assay sollte die Funktion der Domänen bewiesen werden.

Für diesen Assay, sowie für den KS-Beladungsassay für die KS5 aus dem Misakinolid A-Gencluster sollten die Thioester **46** und **47** dargestellt werden (Abbildung 132). Die *E*-Konfiguration des Thioesters **46** wurde hierbei aufgrund des stereospezifischen Motivs der KR angenommen.¹⁴⁵

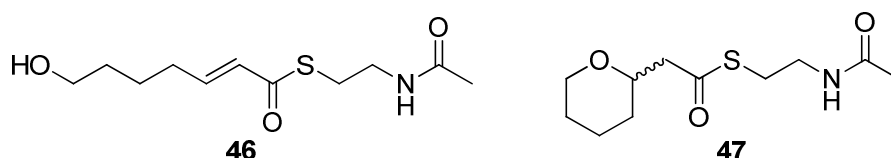


Abbildung 132: Darzustellende Thioester für den Pederin-PS-Test sowie die Misakinolid-KS-Tests.

3.3.1 Synthese des Testsubstrats **46** und des Teststandards **47**

Das Testsubstrat **46** sollte ausgehend vom Lactol **112** synthetisiert werden (Abbildung 133). Dieses sollte über eine Knoevenagel-Kondensation zur Säure **113** umgewandelt werden, die dann mittels Kupplungsreaktion zum Thioester **46** umgesetzt werden sollte.

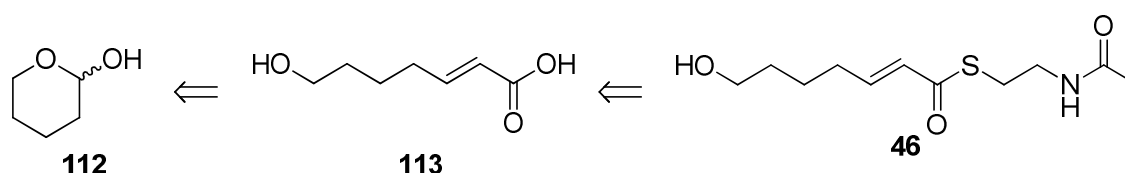


Abbildung 133: Retrosynthese des Testsubstrats **46** für den Pederin PS-Assay.

Der Standard **47** sollte durch Variation der Reaktionsbedingungen der Knoevenagel-Reaktion erhalten werden. Ausgangsprodukt sollte hier ebenfalls das Lactol **112** sein (Abbildung 134). Dieses sollte über die geschlossene Säure **114** in den Thioester **47** umgewandelt werden.

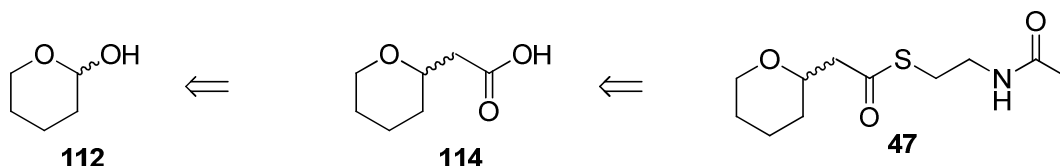


Abbildung 134: Retrosynthese des Teststandards 47 für den Pederin PS-Assay.

Zur Synthese des Thioesters **46** wurde zuerst die Säure **113** nach der Vorschrift von Ragoussis *et al.* über eine Knoevenagelkondensation aus dem Hydroxyaldehyd **112** mit Malonsäure synthetisiert^{146,147} und anschließend aus der Säure über eine Kupplungsreaktion mit *N*-Acetylcysteamin (**57**) der Thioester **46** dargestellt (Abbildung 135).

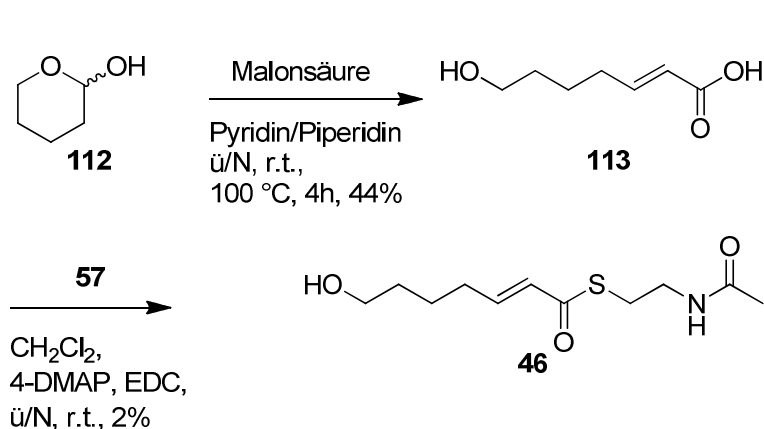


Abbildung 135: Darstellung des Thioesters 46.

Für die Darstellung der Säuren **113** und **114** wurde mit unterschiedlichen Lösemitteln gearbeitet, da gezeigt wurde, dass die Art des Lösemittels einen erheblichen Effekt auf die Struktur des Produkts besitzt. So wurde zur Synthese der Säure **113** Pyridin/ Piperidin zur Reaktion verwendet, was die Verley-Doebner-Variante der Knoevenagel-Kondensation darstellt.¹⁴⁸ Zur Synthese der Säure **114** wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösemittel verwendet (Abbildung 136).¹⁴⁹

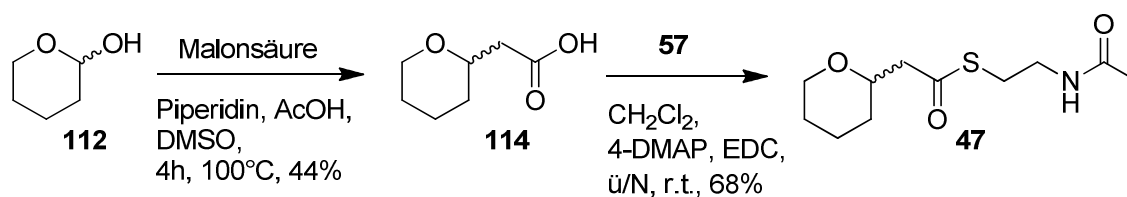


Abbildung 136. Darstellung des Thioesters 47.

Im Fall des geschlossenen Intermediats **47** wurden bei der Thioesterkupplung moderate Ausbeuten von 68% erzielt, die offenkettige Verbindung **46** jedoch bildete sehr schnell den Ringschluß zum Intermediat **47**. Trotzdem gelang es, das offenkettige Testsubstrat **46** mit einer Ausbeute von 2% zu synthetisieren.

3.3.2 Assay zur Überprüfung der Enzymaktivität der Pederin-PS-Domäne

Pederin (**28**), Psymberin (**27**) sowie Onnamid A (**29**) besitzen putative PS-Domänen, die einen Ringschluß katalysieren (Abbildung 137-138).

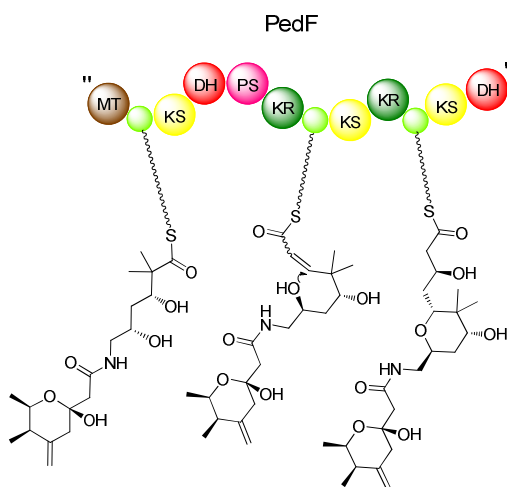


Abbildung 137: Ausschnitt aus der PKS von Pederin, in dem die PS-Domäne lokalisiert ist.

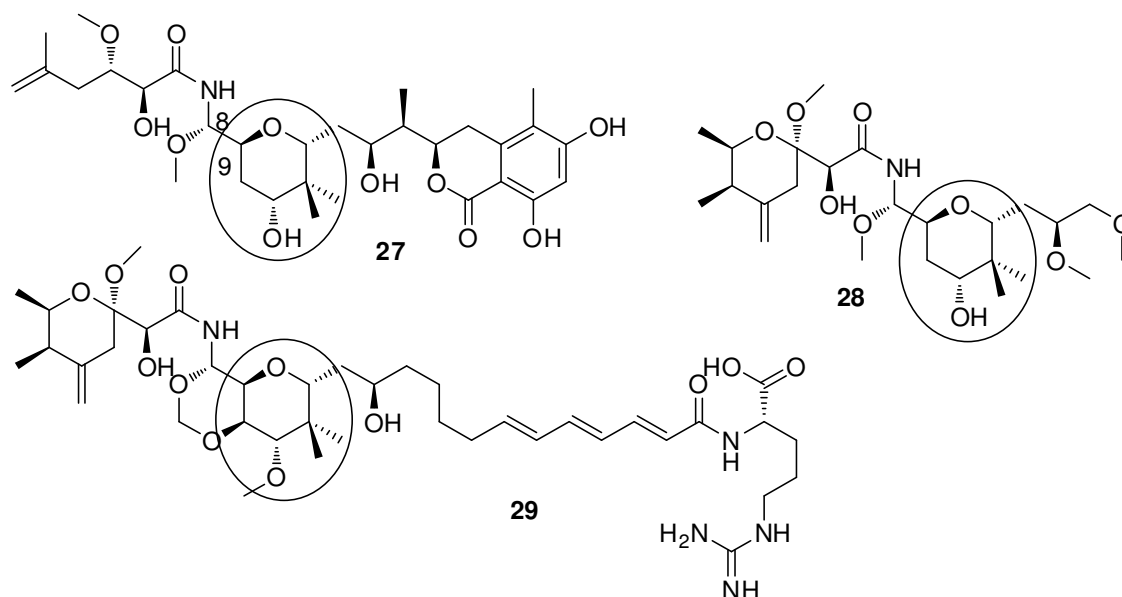


Abbildung 138: Von den PS-Domänen katalysierte Ringbildung in den Strukturen von Psymbirin (27), Onnamid A (29) und Pederin (28).

Für eine Untersuchung dieser putativen PS-Domänen wurden von Petra Pöplau aus dem AK Piel PS-Assays mit dem Testsubstrat **46** durchgeführt. Nach Inkubation von **46** mit der Pederin-PS-Domäne und Vermessung der Assays wurde im HPLC-Lauf ein neues Signal gefunden, das in der Probe mit inaktiviertem Enzym nicht vorhanden war (Abbildung 139).

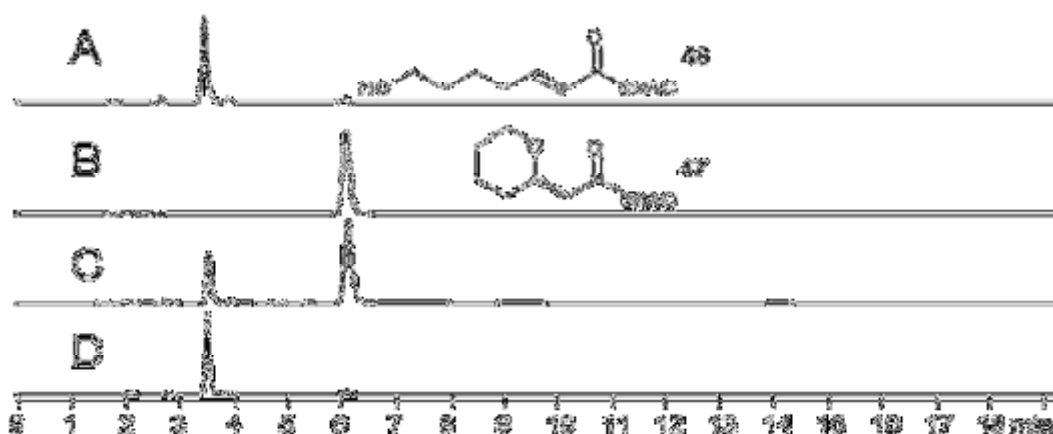


Abbildung 139: HPLC-Messung des Pyransynthesen-Assays von Pederin; A: Referenzspektrum mit Testsubstrat 46, B: Referenzspektrum mit Standard 47, C: Probe mit PS-Domäne, D: Probe mit gekochtem Protein.

Dieses Signal deutete auf eine Veränderung in der Molekülstruktur hin. Durch hochauflöste Massenspektrometrie wurde die exakte Masse der neuen Substanz als

$m/z = 246.1158$ ermittelt, die sich als identisch mit dem eingesetzten Substrat und dem Standard herausstellte. Zudem war die Retentionszeit der neuen Substanz identisch mit der des geschlossenen Standards. Um eine genauere Charakterisierung in Bezug auf die Stereochemie des Ringschlusses durchzuführen, wurden zusätzliche Untersuchungen mit dem von Petra Pöplau synthetisiertem Intermediat **115** vorgenommen (Abbildung 140). Als Standard wurde, ebenfalls von Petra Pöplau, das geschlossene Laktol **3R,7R-116** dargestellt.

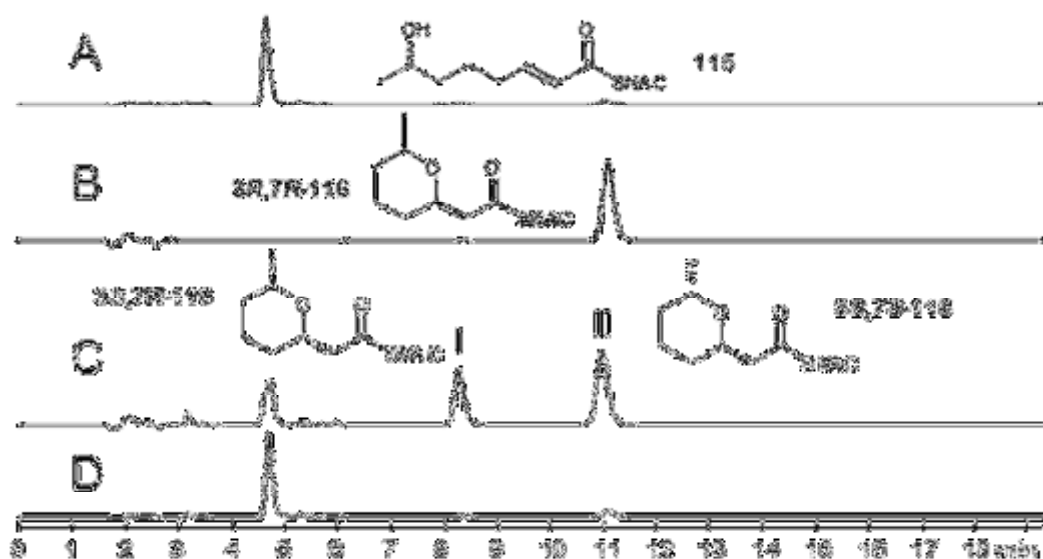


Abbildung 140: HPLC-Messung des Pyransynthesen-Assays von Pederin; A: Referenzspektrum mit Testsubstrat **115**, B: Referenzspektrum mit **3R,7R-116**, C: Probe mit PS-Domäne, D: Probe mit gekochtem Protein.

Nach Durchführung des Assays waren im HPLC-Spektrum zwei neue Signale zu sehen, bei denen eines mit dem des Standards identisch war. Da alle optischen Drehwerte der Isomere der korrespondierenden Säure von **116** literaturbekannt sind, wurden von Dr. Brandon Morinaka die einzelnen Fraktionen der HPLC-Messung hydrolysiert und analysiert.^{29,150} Hier wurde herausgefunden, dass die gesuchten Isomere **3S,7R-116** und **3S,7S-116** waren. Dies lässt auf eine hohe Substrat- und geringe Produktspezifität der PS-Domäne schließen.¹⁵¹

Die Oxakongugat-Addition wurde hier als neuer Reaktionstyp während der Kettenverlängerung beschrieben, die durch eine spezialisierte PKS-Domäne katalysiert wird. Diese Reaktion ist wahrscheinlich relevant für die Biosynthese vieler weiterer bioaktiver Naturstoffe aus Bakterien und Invertebratenquellen. Es ist zu vermuten, dass PS-Domänen sowohl kurzkettige als auch komplexe Vorstufen mit diversen

Substitutionsmustern zu einer breiten Palette an fünf- und sechsgliedrigen Produkten umsetzen. Diese Eigenschaft und die Tatsache, dass die Pederin-PS keine anderen PKS-Komponenten für *in vitro*-Aktivität benötigt, deuten darauf hin, dass PS-Domänen ein vielversprechendes Hilfsmittel für die chemoenzymatische Synthese stereochemisch definierter oxacyclischer Produkte sein könnten.

3.4 Synthese eines Intermediates für Untersuchungen von HrmI und HrmJ aus der Hormaomycin-PKS

Im Biosyntheseweg von Hormaomycin (**32**) (siehe Abschnitt 1.4.1) gibt es unkonventionelle Proteine, die wahrscheinlich für die Bildung von 3-(*trans*-2'-Nitrocyclopropyl)alanin (**48**) ((3-Ncp)Ala) verantwortlich sind. (3-Ncp)Ala **48** ist eine nicht-proteinogene Aminosäure mit außergewöhnlichen Strukturmerkmalen (Abbildung 141).

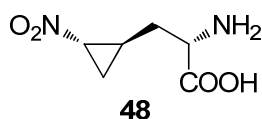


Abbildung 141: Struktur von (3-Ncp)Ala **48**.

Für (3-Ncp)Ala (**48**) wurde von Zeek *et al.* mit Hilfe von Fütterungsexperimenten ein biosynthetischer Ursprung aus *L*-Lysin (**49**) nachgewiesen.¹⁰⁶ Um die Position der initialen Modifikation zu bestimmen, wurde die isotopenmarkierte Aminosäure (**49**) verfüttert. Hierdurch war es möglich, ein Modell der (3-Ncp)Ala-Biosynthese zu postulieren. *L*-Lysin (**49**) wird zunächst an C4 zum Intermediat **50** hydroxyliert, das spontan zum Lacton **51** cyclisiert. Nach Oxidation der Aminofunktion zur Nitrosoverbindung **52** bildet sich das Oxim **53** durch Tautomerisierung. Die putativ letzten Schritte sind die Cyclopropanbildung zu (3-Ncp)Ala **48** durch nukleophilen intramolekularen Angriff der Imindoppelbindung an der γ -Position des Lactons, gefolgt von der Oxidation der Nitrosogruppe von **48** zur Nitrofunktion in **54** (Abbildung 142).¹⁰⁶

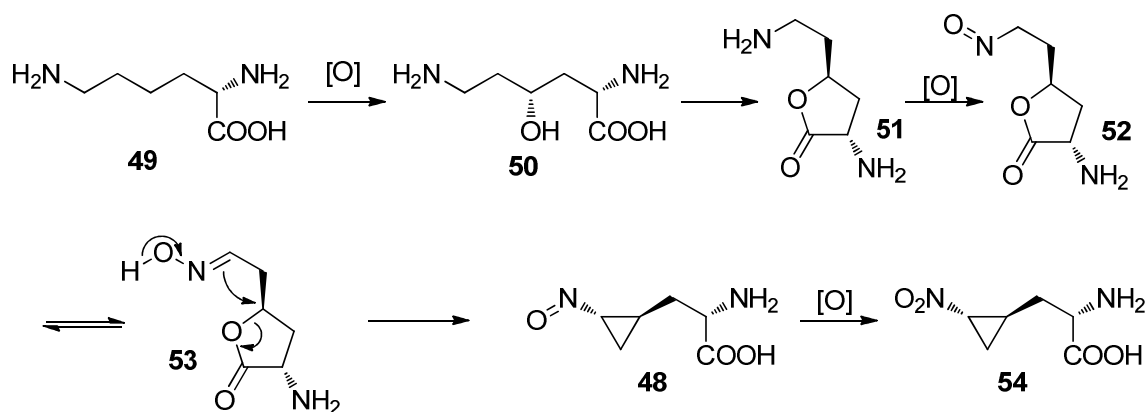


Abbildung 142: Putativer Biosyntheseweg von (3-Ncp)Ala (69).

Durch Ausschlussverfahren und Knock-Out-Studien wurden von Xiaofeng Cai aus dem AK Piel den Genen *hrmI* und *hrmJ* des Hormaomycin-Genclusters eine mögliche Rolle in der (3-Ncp)Ala-Biosynthese zugewiesen.¹⁵² Demnach würde HrmJ L-Lysin (49) an Position vier hydroxylieren, so dass es zur Bildung des Lactons 51 kommt, das an der ϵ -Aminoposition weiter zu 52 oxidiert wird. HrmI würde dann den zweiten Teil der Biosynthese katalysieren, den Ringschluss zum Cyclopropan 69 und die Oxidation zur Nitrogruppe 54.⁸⁸

Um diese Theorien zu überprüfen, sollte das Oxim 53 synthetisiert werden, das in *in vitro*-Studien sowohl als Standard für HrmJ, als auch als Testsubstrat für HrmI verwendet werden kann.

Zur Synthese sollte zunächst ein Weg versucht werden, der mit einer in der Literatur beschriebenen radikalischen Chlorierung von 49 an γ -Position beginnt (Abbildung 143).^{153,154}

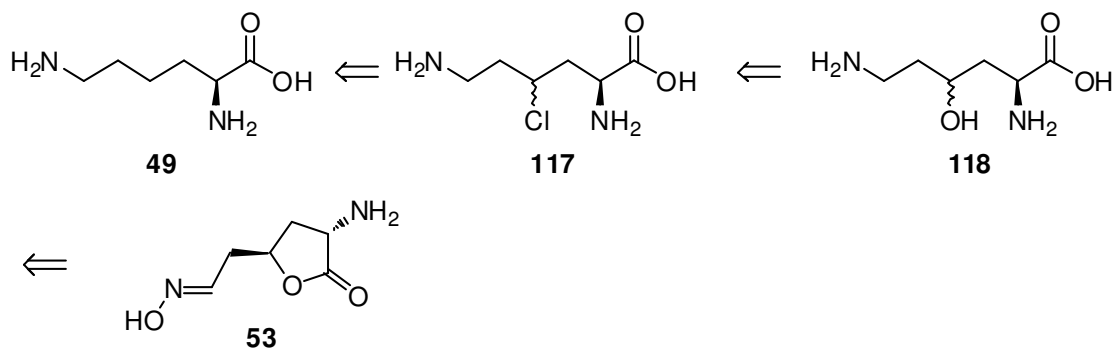


Abbildung 143: Syntheseroute für Testsubstrat 53 über die radikalische Chlorierung von 49 in γ -Position.

Der einfachste Weg zur Synthese schien die radikalische Chlorierung an *L*-Leucin (**49**) nach der Vorschrift von Kollonitsch *et al.*^{153,154} (Abbildung 144) zu sein. Das gewünschte γ -chlorierte Produkt **117** sollte nach dieser Vorschrift in konzentrierter HCl durch UV-Bestrahlung mit einer Ausbeute von 74% erzielt werden. Das anschließend vorliegende Produkt **117** sollte mit Hilfe von Silberacetat in das Hydroxid **118** umgewandelt werden, das säurekatalysiert zum Lacton **119** cyclisieren sollte. Durch Säure werden die Aminofunktionen protoniert und sind somit nicht mehr nukleophil. Die Diastereomere *syn*-**119** und *anti*-**119** sollten dann vor der Oxidation der Aminofunktion über präparative HPLC getrennt werden. Allerdings wurde sowohl bei der versuchten lichtinduzierten Chlorierung in γ -Position in Gegenwart von HCl als auch mit *in situ* hergestelltem Chlorgas das chlorierte Intermediat **117** nicht dargestellt. Ein Grund hierfür könnte eine nicht ausreichende Stärke der eingesetzten UV-Lampe sein.

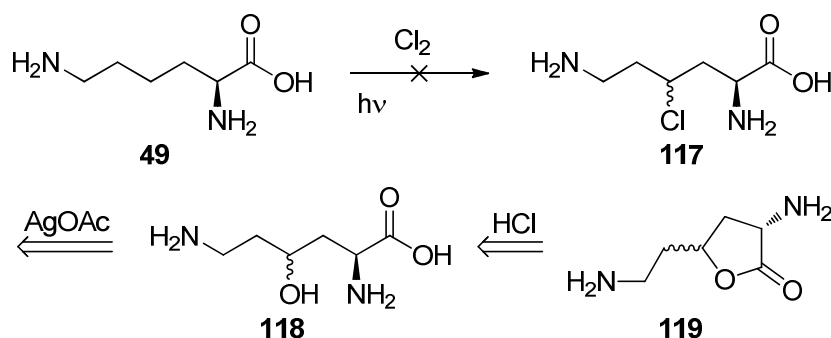


Abbildung 144: Versuchte Darstellung des Lactons **119** durch radikalische Chlorierung.

Alternativ zur Synthese durch die γ -Chlorierung wurde ein Ansatz über eine Epoxidöffnung zur Darstellung des Substrates **53** getestet. Ausgehend vom Amin **120** wurde zunächst basenkatalysiert die Aminogruppe in 58% Ausbeute zum Intermediat **121** *tert*-Butoxycarbonyl-(Boc-)geschützt. Die anschließende Epoxidierung mittels *m*CPBA ergab das Oxiran **122** in 81% Ausbeute (Abbildung 145).^{155,156}

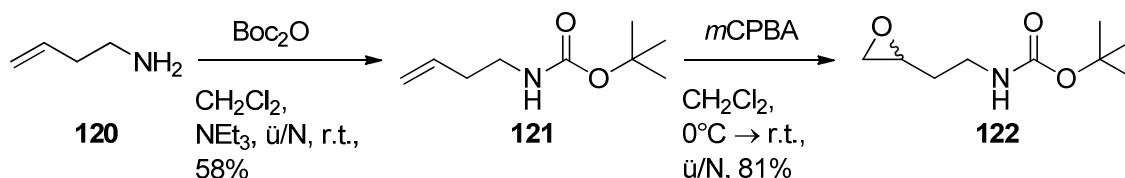


Abbildung 145: Darstellung des Epoxids **122**.

Die baseninduzierte Ringöffnungsreaktion mit der Schiffschen Base **123** gelang nicht.¹⁵⁷ Es wurden nur die Edukte reisoliert. Es wurden verschiedene Basen wie Lithiumdiisopropylamid (LDA), NaH und Kalium-*tert*-butanolat (KO*t*Bu) sowie der Einsatz einer Lewis-Säure und Erhitzen der Reaktionsmischung zur Aktivierung des Epoxids versucht. Leider verliefen alle Versuche der Kupplung erfolglos. Wahrscheinlich ist die sterische Repulsion der Schiffschen Base zu groß, so dass ein Angriff an mit BF₃-aktiviertem Oxiran nicht mehr möglich ist. (Abbildung 146).

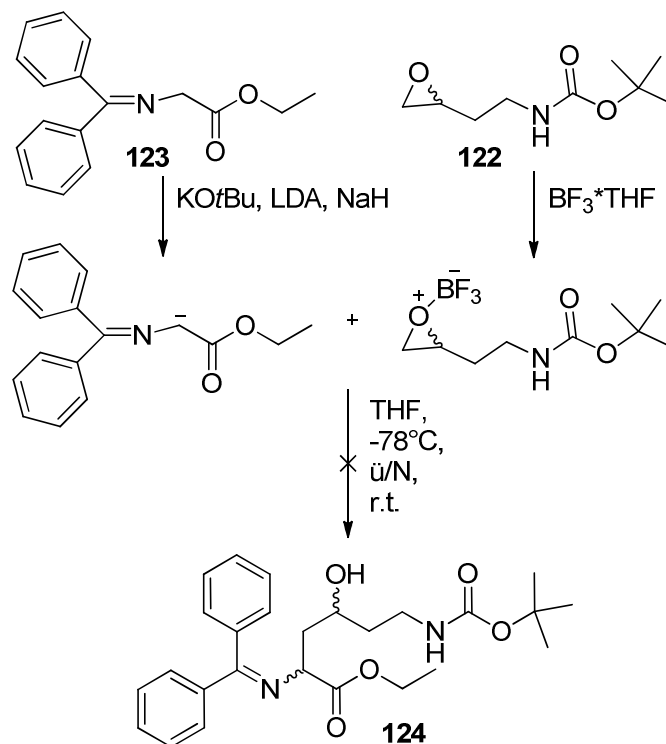


Abbildung 146: Umsetzung des Imins **123** mit dem Epoxid **122**.

Ein weiterer Versuch zur Darstellung des Oxims **53** erfolgte auf einem Grignard-Addition-basierten Ansatz (Abbildung 147). Zunächst sollte mit *L*-Serin die Durchführbarkeit des Ansatzes getestet werden, da dieses im Vergleich zum benötigten *L*-Homoserin preiswerter ist.

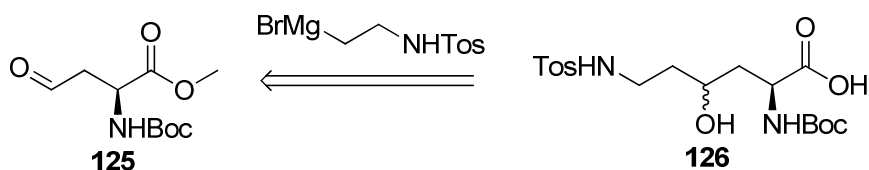


Abbildung 147: Grignard-Ansatz zur Darstellung des Oxims **53**.

Das *L*-Serin (**127**) wurde an der Aminofunktion in 69% Ausbeute zum Intermediat **128** Boc-geschützt. Anschließend wurde die Carboxyfunktion mit 68% Ausbeute zum Methylester **129** derivatisiert (Abbildung 148).^{158,159}

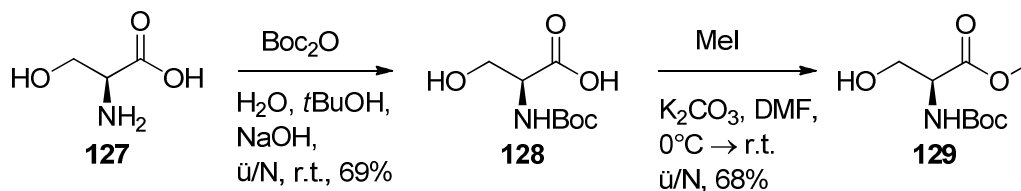


Abbildung 148: Schützung des *L*-Serins (**127**).

Das Bromid **130** wurde mit der Tosylschutzgruppe mit einer Ausbeute von 76% zum Intermediat **131** geschützt (Abbildung 149).¹⁶⁰



Abbildung 149: Darstellung des tosylgeschützten Bromids **131**.

Die Oxidation des Alkohols **129** zum Aldehyd **125** war mit keiner der versuchten Methoden erfolgreich, also konnte diese Synthesestrategie nicht weiter verfolgt werden (Abbildung 150).

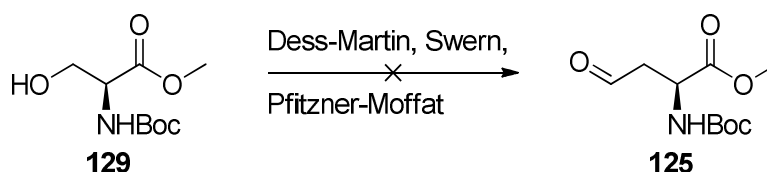


Abbildung 150: Versuchte Oxidation des Alkohols **129** zum Aldehyden **125**.

Eine weitere Synthesestrategie zur Darstellung des gewünschten Produktes **53** war die von Bergmann *et al.* beschriebene Cyclisierung von Glucosaminsäure (**132**) zu den isomeren Lactonen *E*-**133** und *Z*-**133**, was mit einer Ausbeute von 40% gelang (Abbildung 151).^{161,162}

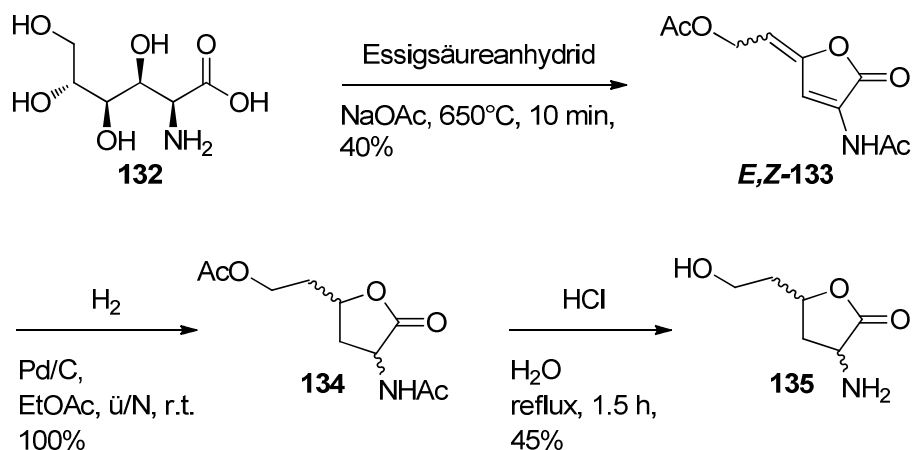


Abbildung 151: Darstellung der isomeren Lactole 135.

Im Anschluss daran wurden die *E,Z*-Isomere *E*-133 und *Z*-133 mittels Palladium-Katalyse mit einer Ausbeute von 100% zum diastereomeren Lactol 134 hydriert. Die folgende säurekatalysierte Entschützung zu 135 verlief mit einer Ausbeute von 45%.¹⁶³

Die absolute Konfiguration des Lactols 135 wurde mittels 2D-¹H-NMR bestimmt. Die NOESY-Experimente zeigten eine 1,3-*syn*-Stellung. Da das Zielsubstrat jedoch *anti*-konfiguriert ist, wurde dieses Isomer nicht weiter verwendet.

Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung des Oxims 53 ergab sich über das kommerziell erhältliche geschützte *L*-Asparaginsäurederivat 136 nach Pasunooti *et al.*¹⁶⁴ Zunächst wurde die Carboxyfunktion als *tert*-Butylester 137 in 79% Ausbeute geschützt und die benzylgeschützte Seite zum Intermediat 138 mit einer Ausbeute von 100% entschützt. Die mit DCC vermittelte Reaktion mit Ethanthiol ergab den Thioester 139 in 86% Ausbeute. Nach Bildung des Thioesters 139 scheiterte die Synthesestrategie an der Reduktion zum Aldehyd 140 mit Triethylsilan und Palladium auf Kohle (Abbildung 152), obwohl diese Reaktion in der Literatur beschrieben wurde, wurde immer nur das Edukt 139 reisolirt.^{165,166}

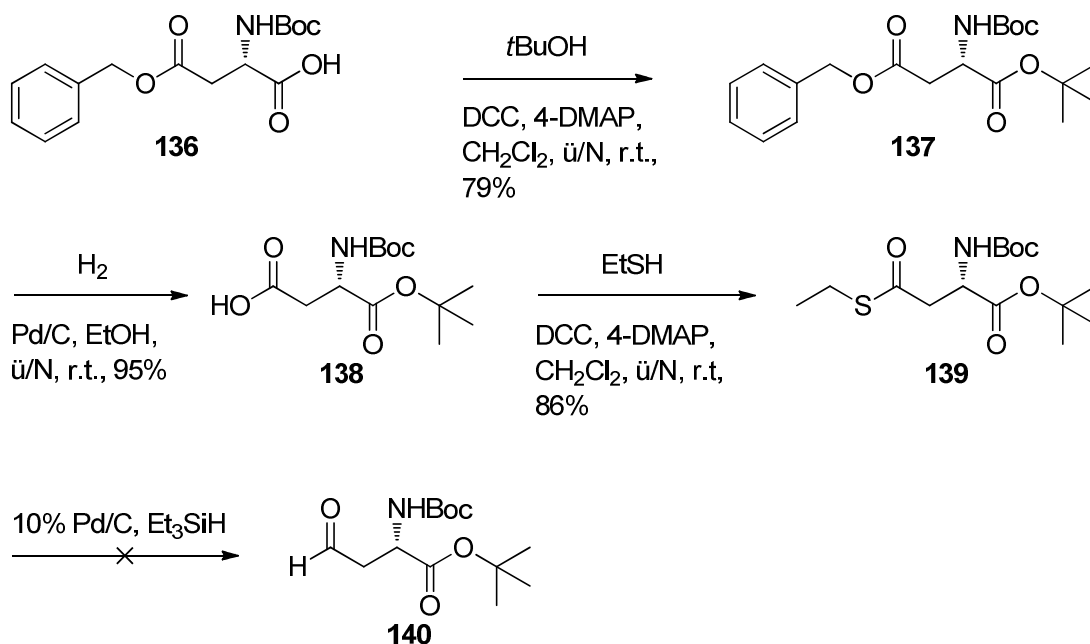


Abbildung 152: Versuchte Reduktion des Thioesters **139** mit Pd/C.

Daher wurde die Säure **138** in 79% Ausbeute intermediär zum primären Alkohol **141** reduziert.^{167,168} (Abbildung 153). Sowohl die Dess-Martin- als auch die Swern-Oxidation ergaben den Aldehyd **140** in guten Ausbeuten von 80% und 85%.

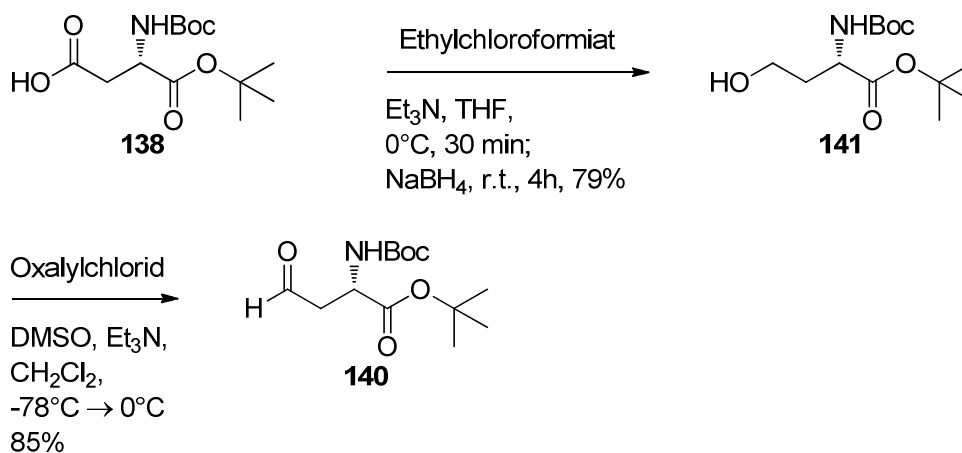


Abbildung 153: Alternativer Reaktionsweg nach Qu *et al.* zum Aldehyd **140**.

Im Anschluß daran sollte der Aldehyd mittels der Reformatsky-Reaktion in den Methylester *anti*-**142** überführt werden. Dieser ist nach der nicht diastereoselektiven Reaktion über Säulenchromatographie vom *syn*-Intermediat trennbar. Der Methylester *anti*-**142** sollte dann mittels Natriumborhydrid zum Alkohol **143** reduziert werden und die

Schutzgruppen unter aciden Bedingungen abgespalten werden. Die Säure **144** sollte unter diesen Bedingungen einen Ringschluß zum Lacton *anti*-**135** eingehen. Nach Schützung der freien Aminofunktion mit Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) sollte der Alkohol **145** zum Aldehyd **146** oxidiert werden, der dann mit Hydroxylamin in das Oxim **53** umgewandelt werden sollte (Abbildung 154). Aus zeitlichen Gründen konnte diese Syntheseroute nicht weiter verfolgt werden.

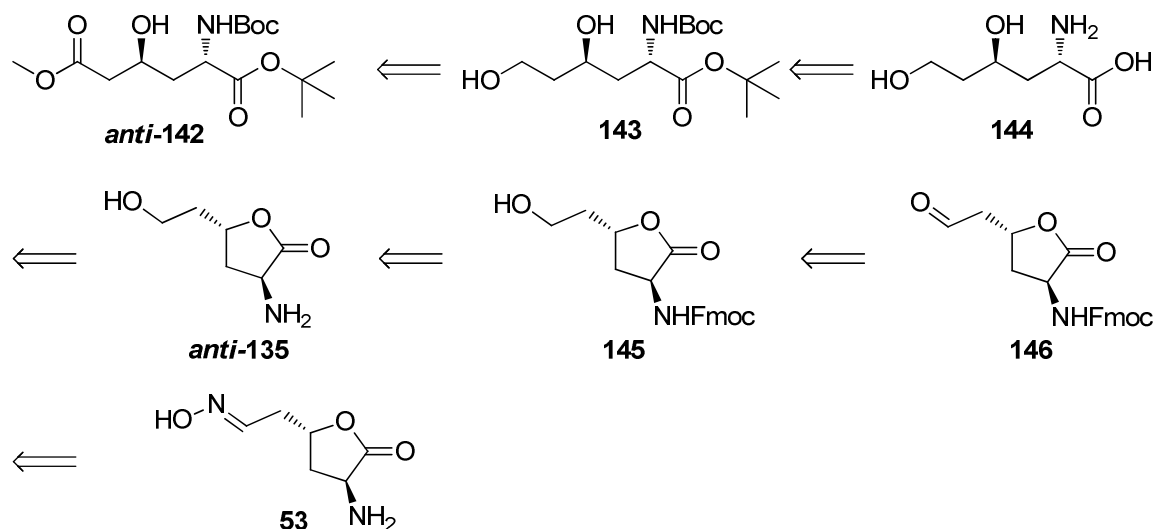


Abbildung 154: Weitere Syntheseroute zum Oxim 70.

3.5 Synthese eines Intermediats für Untersuchungen von CorB aus der Corallopyronin A-PKS/NRPS

Das ungewöhnliche KS-artige Enzym CorB ist vermutlich für einen Pyran-Ringschluss innerhalb des Biosyntheseweges von Corallopyronin A (**33**) verantwortlich (Abbildung 155).

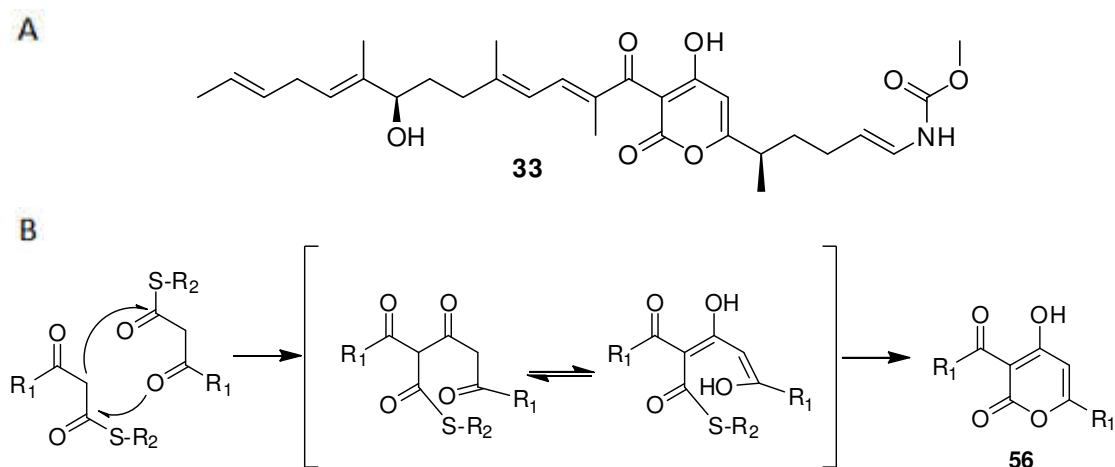


Abbildung 155: A: Struktur von Coralopyronin A (33); B: Bildung des Pyronringschlusses zum Intermediat 56; R_1 : C_8H_{18} , R_2 : C_4H_8NO .

Um diese Funktion zu beweisen, wurde der Thioester **55** dargestellt (Abbildung 156).

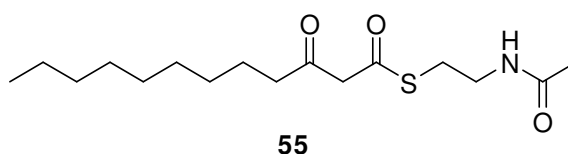


Abbildung 156: Testsubstrat 55 für CorB-Assays.

Dieser soll in *in vitro*-Assays und zur Co-Kristallisation mit CorB von Dr. Till Schäberle umgesetzt werden. Hierbei soll ein Ringschluß zwischen zwei Molekülen des Substrats getestet werden. Hierzu sollte ausgehend von Decanoylsäure **147** das Intermediat **148** synthetisiert werden, das in den Methylester **149** überführt werden sollte. Durch eine anschließende Schützung der Ketofunktion durch eine Acetalschutzgruppe zum Intermediat **150** sollte dieses anschließend an der Esterfunktion zur Säure **151** entschützt werden. Aus dieser Säure sollte dann der Thioester **152** dargestellt werden, der anschließend zum gewünschten Intermediat 53 entschützt werden sollte (Abbildung 157).

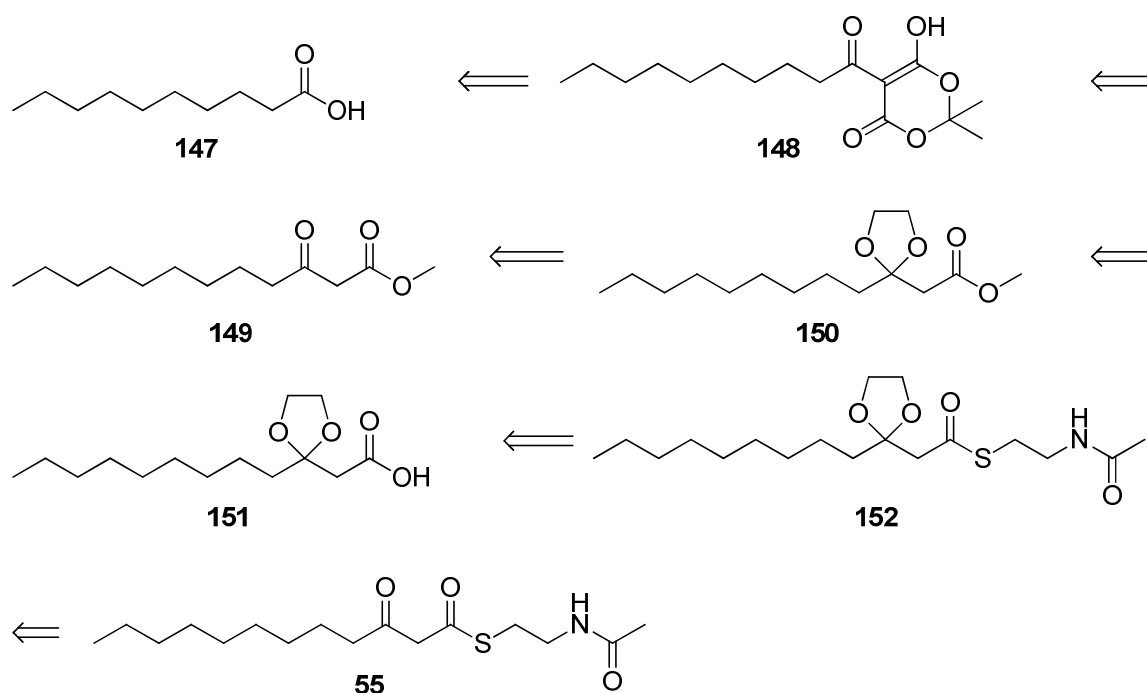


Abbildung 157: Retrosynthese von Testsubstrat 55.

Die ersten vier Stufen der Synthese wurden nach Kanchanabanca *et al.* durchgeführt.¹⁶⁹ Zunächst wurde Dodecanoylsäure (**147**) mit Meldrums Säure zum Enolester **148** mit einer Ausbeute von 94% umgesetzt, der dann mit Methanol in 64% Ausbeute in den Methylester **149** umgewandelt wurde (Abbildung 158). Die Carbonylfunktion wurde mit 27% Ausbeute als Acetal **150** geschützt. Die anschließende Entschützung des Methylesters **151** ergab die Carbonsäure **152** mit einer Ausbeute von 84%. Diese wurde dann mit *N*-Acetylcysteamin (**57**) in 56% Ausbeute zum Thioester **55** umgesetzt. Zuletzt wurde die Acetalschutzgruppe unter sauren Bedingungen mit einer Ausbeute von 45% entfernt.

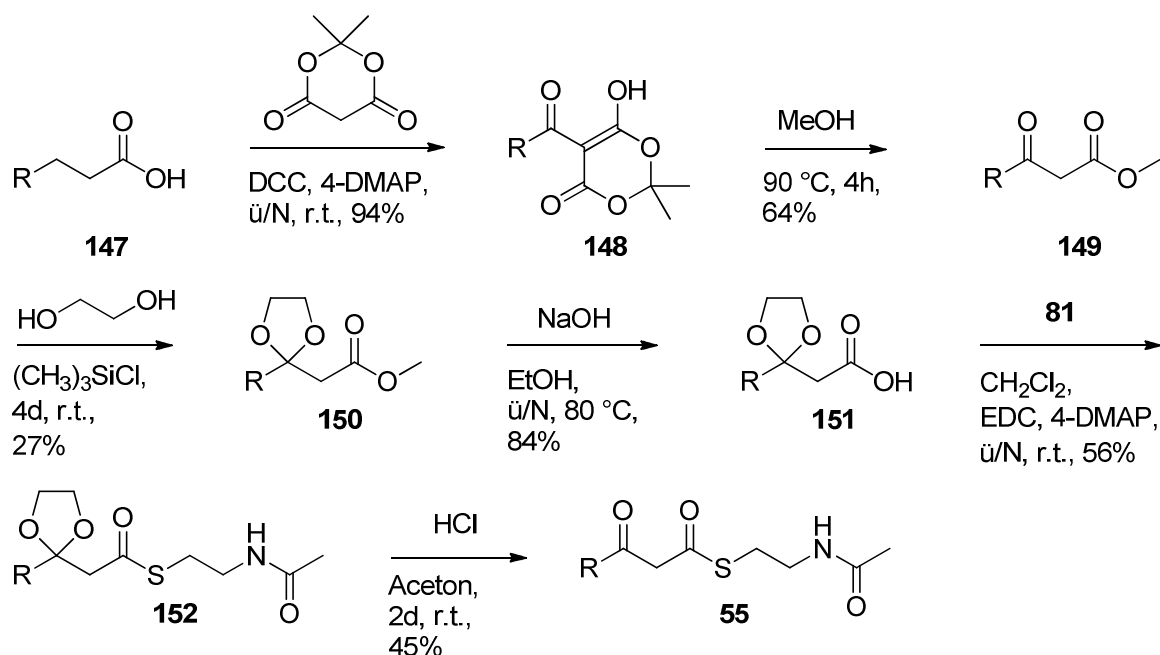


Abbildung 158: Darstellung des β -Oxo-Thioesters **55**, $R = C_8H_{18}$.

Die bisherigen Untersuchungen mit CorB sahen vielversprechend aus. Die Signalintensität des Testsubstrats **55** nahm während der Inkubation mit CorB im Massenspektrum ab. Dies deutet auf einen Verbrauch des Thioesters **55** während der Biosynthese hin. Weitere Untersuchungen stehen noch aus.

3.6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die sieben verschiedenen Testsubstrate **36–43** für Untersuchungen an KS-Domänen von PKS-Genclustern synthetisiert. Die einstufigen Synthesen mittels der Kupplung der jeweiligen Säuren mit *N*-Acetylcysteamin (**57**) verliefen hierbei mit guten Ausbeuten von 40% für Testsubstrat **38** zu 90% für Testsubstrat **40**. Die Testsubstrate **41** sowie **42** wurden auf anderem Wege dargestellt. Testsubstrat **41** wurde mit einer Ausbeute von 32% über die Ringöffnung des Lactons **64** gewonnen. Der Thioester **42** wurde über eine zweistufige Synthese mit einer Ausbeute von 1% erhalten, maßgeblich für die schlechte Ausbeute war die Umlagerungstendenz des ungesättigten Intermediates **42**.

Ebenfalls für diese Untersuchungen wurden die ersten drei KS-Domänen aus dem Psymberin-Gencluster erfolgreich kloniert und überexprimiert.

Die Assays der KS-Domänen mit den Testsubstraten **36–43** verliefen erfolgreich. PsyA-KS1 und KS2 wiesen eine nur geringe Substratspezifität auf, wohingegen PsyD-KS3 und Bae-KS5 eine hohe Spezifität gegenüber *C*-verzweigten Thioestern zeigten.

Hier wurde von Matthew Jenner aus dem AK Oldham eine neue MS-basierte Methode zur Untersuchung von *trans*-AT-PKS entwickelt. Die erhaltenen Resultate können unter anderem für die kombinatorische Biosynthese nützlich sein. So können spezifische KS-Domänen für die Generierung gewünschter PKS-Produkte genutzt werden.

Weiterhin wurde von Matthew Jenner mit Hilfe der Substrate und KS-Domänen eine simple Methode zur Erzeugung von Acyl-ACPs gezeigt, die in der Lage sind, ihre Acyl-Einheit an andere Domänen abzugeben. Hier liegt viel Potential, da viele Enzyme nicht in der Lage sind, Thioester als Substrate zu akzeptieren und die Acyl-ACPs dem natürlichen Intermediat ähnlicher sind als Thioester.

Für die putativen α -Hydroxylasen PsyC und PsyK sowie die *O*-Methyltransferase PsyD wurden die Thioester **44b** als Standard für PsyD oder Substrat für PsyK sowie das Intermediat **45b** als Testsubstrat für PsyC dargestellt. Die Synthese des Thioesters **44b** verlief über sieben Stufen. Er wurde trotz Enantiomerentrennung mit einer Gesamtausbeute von 2.8% erzielt. Für **45b** war eine Synthese über zehn Stufen mit einer Ausbeute von 6.6% nötig.

Das Testsubstrat **46** sowie der Teststandard **47** wurden im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich synthetisiert und von Petra Pöplau in einem Assay mit der Pyransynthasedomäne von Pederin umgesetzt. Die Gesamtausbeute für das offenkettige Testsubstrat **46** lag, trotz der Tendenz des Intermediates **46** einen Ringschluß zum geschlossenen Standard **47** auszubilden, noch bei 0.9%. Die Gesamtausbeute des Standards **47** betrug 30%. Hier wurde von Petra Pöplau ein neuer Reaktionstyp für PKS-Domänen nachgewiesen: die Oxakongugat-Addition. Vermutlich sind PS-Domänen in der Lage Vorstufen unterschiedlichster Kettenlängen in fünf- sowie sechsgliedrige Ringe umzuwandeln. Diese Eigenschaft macht diese Domänen sowohl für chemoenzymatische Synthesen als auch für die kombinatorische Biosynthese sehr interessant.

Für CorB aus dem Coralopyronin-Gencluster wurde der langkettige Thioester **55** erfolgreich über eine sechsstufige Synthese dargestellt. Die Gesamtausbeute lag bei 3.7%. Untersuchungen stehen noch aus, bisherige Ergebnisse sehen aber vielversprechend aus.

4. Experimenteller Teil

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Alle kommerziell erworbenen Chemikalien wurden im Allgemeinen ohne weitere Aufreinigung verwendet, andernfalls wurde die Aufreinigung zu Beginn der entsprechenden Synthese beschrieben. Alle Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen: Alfa Aesar (Karlsruhe), Acros Organics (Nidderau), ASM Research Chemicals (Hannover), Sigma Aldrich (Taufkirchen), TCI (Eschborn), Carbolution (Saarbrücken) und VWR (Darmstadt).

Die Reinigung und Trocknung der Lösungsmittel erfolgte nach gängigen Methoden.¹⁷⁰

4.1.2 Kernresonanzspektroskopie

¹H-NMR: Bruker DP300 (300 MHz), Bruker DP400 (400 MHz) und Bruker DRX 500 (500 MHz). Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Verschiebungen δ sind in parts per million [ppm] angegeben und beziehen sich auf das nicht vollständig deuterierte Lösungsmittel, das als interner Standard dient: CHCl₃ (δ = 7.26 ppm), DMSO (δ = 2.50 ppm), H₂O (δ = 4.79 ppm).¹⁷¹ Charakterisierung der Signalaufspaltung: s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, q = Quartett, h = Heptett, m = Multiplett, br = verbreitertes Signal. Die Spektren wurden nach 1. Ordnung ausgewertet. Alle Kopplungskonstanten *J* werden in Hertz [Hz] angegeben und sind Betragswerte. Die Zuordnung der Signale erfolgt entsprechend den Nummerierungen der angegebenen Skizze.

¹³C-NMR: Bruker DP300 (75 MHz), Bruker DP400 (100 MHz). Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur aufgenommen. Alle Verschiebungen δ sind in parts per million [ppm] angegeben und beziehen sich auf das deuterierte Lösungsmittel, das als interner Standard dient: CDCl₃ (δ = 77.16 ppm), *d*₆-DMSO (δ = 39.52 ppm).¹⁷¹ Die Zuordnung der Signale erfolgt entsprechend den Nummerierungen der angegebenen Skizze.

„*“ bedeutet: die Signale sind nicht eindeutig zuzuordnen und können somit in der Auswertung auch vertauscht sein.

4.1.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektren von synthetisierten Verbindungen wurden von Frau Sondag und Frau Dr. Engeser am *Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie* der Universität Bonn aufgenommen. Für die Elektrosprayionisation-Spektren (ESI) und die High-Resolution-MS-Spektren (HRMS) wurde ein Bruker micrOTOF-Q Flugzeitspektrometer verwendet.

Die Massenspektren der Proteinassays wurden von Matthew Jenner an der Universität von Nottingham (UK) aufgenommen. Für die nanoESI-Spektren wurde ein Waters SYNAPTTMHDMSTM verwendet. Die Daten wurden mit dem Programm MassLynxTM 4.1 analysiert.

4.1.4 Infrarotspektroskopie

Die IR-Spektren wurden mit einem FT-IR-ATR-Spektrometer Nicolet 380 der Firma *Thermo* aufgenommen. Die Angabe der Wellenzahlen erfolgte in gerundeten, ganzen Zahlen.

4.1.5 Dünnschichtchromatographie

Als stationäre Phase dienten mit Kieselgel beschichtete Aluminiumplatten (Merck, Kieselgel 60 F₂₅₄). Als Anfärbereagenzien wurden Seebach-Reagenz (2.50 g Molybdatophorsäure, 5.00 g Cer(IV)sulfat Tetrahydrat, 16 mL konz. Schwefelsäure, 450 mL Wasser), Kaliumpermanganat-Reagenz (2.00 g Kaliumpermanganat, 20.00 g Kaliumcarbonat, 0.25 g Natriumhydroxid, 300 mL Wasser) und Ninhydrin-Reagenz (0.2% Ninhydrin in Ethanol) verwendet.¹⁷² Die Entwicklungen erfolgten bei 250 °C im Heißluftstrom.

4.1.6 Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel der Firma *Merck* (Korngröße 0.040 – 0.063 mm, 230–400 mesh, ASTM) verwendet. Die jeweils verwendeten Eluentengemische wurden in den entsprechenden Synthesevorschriften vermerkt.

4.1.7 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die HPLC-Messungen wurden von Herrn Andreas Schneider am *Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie* der Universität Bonn aufgenommen. Die HPLC-Reinigungen wurden mittels eines Knauer Eurospher II 100-5 C18-Systems (5 µm; 4.00 mm x 250 mm mit integrierter Vorsäule) durchgeführt. Die Detektion erfolgte über einen eingebauten Photodiodenarraydetektor bei 190-600 nm Wellenlänge. Die Bedingungen für die HPLC-Aufreinigung wurden bei den entsprechenden Synthesevorschriften vermerkt.

Die Analyse von Enzymassays mittels HPLC wurde eigenständig auf einer computergesteuerten Anlage der Firma Jasco (Darmstadt) mit einem zugehörigen MD-2015 Multiwavelength Detektor von Jasco durchgeführt. Zur Auswertung der Messergebnisse wurde das Programm ChromPass (Jasco) verwendet.

4.1.8 HPLC-HRMS

Die HPLC-HRMS-Messungen wurden von Frau Peters-Pflaumbaum am *Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie* der Universität Bonn aufgenommen. Für die HPLC-massenspektrometrischen Untersuchungen (HPLC-HRMS) war ein microOQ-TOF-Flugzeitspektrometer der Fa. Bruker Daltonik GmbH (Bremen) mit Apollo-ESI-Quelle mit einer HPLC-Anlage Agilent-1200-Serie gekoppelt. Das System wurde mit der HyStar Software (Bruker) gesteuert. Die Kalibrierung erfolgte intern mit Natriumformiat. Die Genauigkeit der Massenbestimmung lag bei 5 ppm (exakte Masse). Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software Data Analysis der Firma Bruker. Die verwendeten HPLC-Methoden wurden in der entsprechenden Synthesevorschrift vermerkt.

Für Messungen der Proteinassays wurde die UPLC-HESI-HRMS (Ultra-performance liquid chromatography - heated electrospray ionization - high-resolution mass

spectrometry) verwendet.¹⁷³ Die Daten wurden über eMZed ausgewertet.¹⁷⁴ Das Gerät war ein Ultimate 3000 UPLC System. Die Messungen erfolgten über eine Phenomenex Kinetex 2.6 μm C18 100 Å (150 \times 4.6 mm) Säule bei 27° C.

4.1.9 Allgemeine Arbeitsmethoden

Alle Reaktionen mit sauerstoff- oder feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien wurden in unter Vakuum ausgeheizten und mit Argon gespülten Reaktionsgefäßen durchgeführt. Absolutierte Lösungsmittel und flüssige Substanzen wurden über Plastikspritzen zugegeben, die gegebenenfalls zuvor mit Argon geflutet wurden.

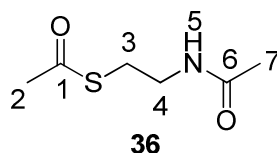
4.2 Chemische Arbeiten

4.2.1 Synthese der Substrate 36-42 für die KS-Regionen

S-Acetyl-*N*-acetylcysteamin (36)

Eine Lösung aus Essigsäure (5.00 mmol, 0.30 g) in Dichlormethan (15 mL) wurde für 15 min auf 0 °C gekühlt. 4-DMAP (1.00 mmol, 0.12 g), EDC (6.00 mmol, 1.15 g) und *N*-Acetylcysteamin (**57**) (6.00 mmol, 0.72 g) wurden zugegeben, und die Lösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Es wurde mit gesättigter Ammoniumchloridlösung (10 mL) gestoppt und mit Dichlormethan (3 \times 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, EtOAc, R_f = 0.36) und der Thioester **36** wurde mit einer Ausbeute von 70% (3.51 mmol, 0.63 g) erhalten.

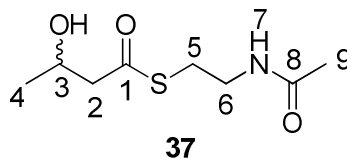
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 6.07 (bs, 1H, H-5), 3.38 (dt, ³*J* = 6.3 Hz, ³*J* = 6.3 Hz, 2H, H-4), 2.99 (t, ³*J* = 6.5 Hz, 2H, H-3), 2.32 (s, 3H, H-2), 1.94 (s, 3H, H-7); ¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 196.4 (C-1), 170.5 (C-6), 39.6 (C-4), 30.7 (C-2), 28.8 (C-3), 23.2 (C-7); MS: (ESI, 10 eV, *m/z* (%)) 184.0 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₆H₁₁NO₂SNa 184.0403; gemessen: 184.0402 [M+Na]⁺; IR [cm⁻¹] ν_{max} : 3291, 1686, 1652, 1542, 1357, 1288, 1132, 954.



***S*-(3-Hydroxybutyl)-*N*-acetylcysteamine (37)**

Eine Lösung aus 3-Hydroxybutansäure (**86**) (9.61 mmol, 1.00 g) in Dichlormethan (20 mL) wurde für 15 Minuten auf 0 °C gekühlt. 4-DMAP (kat. Mengen), EDC (13.00 mmol, 2.49 g) und *N*-Acetylcysteamine (**57**) (13.00 mmol, 1.55 g) wurden zugegeben, und die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit gesättigter Ammoniumchloridlösung (15 mL) gestoppt und mit Dichlormethan (3x20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, EtOAc, R_f = 0.35) und der Thioester **37** wurde mit 63% (4.16 mmol, 0.84 g) Ausbeute erhalten.

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 6.19 (brs, 1H, H-7), 4.22 – 4.17 (m, 1H, H-3), 3.42 – 3.37 (m, 2H, H-6), 3.06 (brs, 1H, -OH), 3.02 – 2.98 (m, 2H, H-5), 2.6 – 2.67 (m, 2H, H-2), 1.93 (s, 3H, H-9), 1.19 (d, ³J = 6.4 Hz, 3H, H-4).

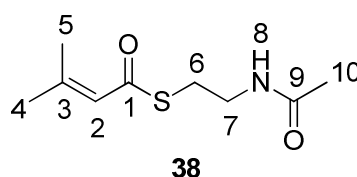


***S*-(3-Methylcrotonyl)-*N*-acetylcysteamine (38)**

Eine Lösung aus 3,3-Dimethylacrylsäure (5.00 mmol, 0.50 g) in Dichlormethan (15 mL) wurde für 15 Minuten auf 0 °C gekühlt. 4-DMAP (1.00 mmol, 0.12 g), EDC (6.00 mmol, 1.15 g) und *N*-Acetylcysteamine (**57**) (6.00 mmol, 0.72 g) wurden zugegeben, und die Lösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Es wurde mit gesättigter Ammoniumchloridlösung (10 mL) gestoppt und mit Dichlormethan (3x15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, EtOAc, R_f = 0.46) und der Thioester **38**

wurde als kristalliner weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 40% (1.98 mmol, 0.40 g) erhalten.

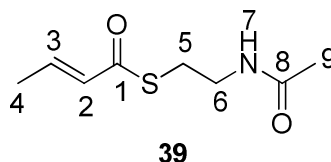
$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 6.01 – 6.00 (m, 1H, H-2), 3.44 (dt, $^3J = 6.1$ Hz, $^3J = 6.1$ Hz, 2H, H-7), 3.04 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 2H, H-6), 2.15 (s, 3H, H-5), 1.95 (s, 3H, H-10), 1.88 (s, 3H, H-4); $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 189.6 (C-1), 170.4 (C-9), 155.0 (C-3), 123.1 (C-2), 40.1 (C-7), 28.5 (C-6), 27.4 (C-5), 23.3 (C-10), 21.4 (C-4); MS: (ESI, 10 eV, m/z (%)) 210.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{SH}$ 202.0896 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gemessen: 202.0893 $[\text{M}+\text{H}]^+$; IR $[\text{cm}^{-1}]$ ν_{max} : 3294, 1655, 1647, 1629, 1553, 1093, 1007, 844.



S-Crotonoyl-N-acetylcysteamin (39)

Eine Lösung aus Crotonsäure (5.00 mmol, 0.43 g) in Dichlormethan (15 mL) wurde für 15 Minuten auf 0 °C gekühlt. 4-DMAP (1.00 mmol, 0.12 g), EDC (6.00 mmol, 1.15 g) und N-Acetylcysteamin (**57**) (6.00 mmol, 0.72 g) wurden zugegeben, und die Lösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Es wurde mit gesättigter Ammoniumchloridlösung (10 mL) gestoppt und mit Dichlormethan (3x15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , EtOAc, $R_f = 0.47$) und der Thioester **39** wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 54% (2.73 mmol, 0.51 g) erhalten.

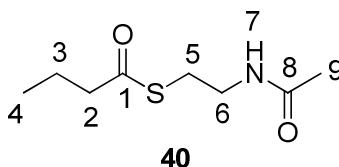
$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 6.93 (dq, $^3J = 13.8$ Hz, $^3J = 6.9$ Hz, 1H, H-3), 6.15 (dq, $^3J = 13.8$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, H-2), 5.97 (brs, 1H, H-7), 3.45 (dt, $^3J = 6.4$ Hz, $^3J = 6.4$ Hz, 2H, H-6), 3.08 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 2H, H-5), 1.95 (s, 3H, H-9), 1.89 (dd, $^3J = 6.9$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 3H, H-4); $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 190.5 (C-1), 170.6 (C-8), 142.1 (C-3), 130.1 (C-2), 40.1 (C-6), 28.4 (C-5), 23.4 (C-9), 18.2 (C-4); MS: (ESI, 10 eV, m/z (%)) 224.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{SH}$ 188.0740 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gemessen: 188.0743 $[\text{M}+\text{H}]^+$; IR $[\text{cm}^{-1}]$ ν_{max} : 3294, 1655, 1638, 1548, 1285, 1053, 912.



S-n-Butanoyl-N-acetylcysteamin (40)

Eine Lösung aus Butansäure (5.00 mmol, 0.45 g) in Dichlormethan (15 mL) wurde für 15 Minuten auf 0 °C gekühlt. 4-DMAP (1.00 mmol, 0.12 g), EDC (6.00 mmol, 1.15 g) und N-Acetylcysteamin (**57**) (6.00 mmol, 0.72 g) wurden zugegeben, und die Lösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Es wurde mit gesättigter Ammoniumchloridlösung (10 mL) gestoppt und mit Dichlormethan (3x15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, EtOAc, R_f = 0.37) und der Thioester **40** wurde mit einer Ausbeute von 90% (4.47 mmol, 0.85 g) erhalten.

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 6.04 (bs, 1H, H-7), 3.41 (dt, ³J = 6.3 Hz, ³J = 6.3 Hz, 2H, H-6), 3.00 (t, ³J = 6.5 Hz, 2H, H-5), 2.52 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, H-2), 1.95 (s, 3H, H-9), 1.67 (tq, ³J = 7.3 Hz, ³J = 7.5 Hz, 2H, H-3), 0.89 (t, ³J = 7.4 Hz, 3H, H-4); ¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 200.2 (C-1), 170.5 (C-8), 46.0 (C-2), 39.9 (C-6), 28.5 (C-5), 23.3 (C-9), 19.3 (C-3), 13.6 (C-4); MS: (ESI, 10 eV, m/z (%)) 212.1 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): C₈H₁₅NO₂SH 190.0896; gemessen: 190.0896 [M+Na]⁺; IR [cm⁻¹] ν_{max}: 3290, 2965, 2934, 1686, 1652, 1546, 1287, 986.

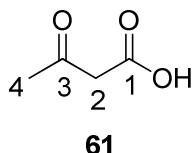


3-Oxobutansäure (61)

Ethyl-3-oxobutanoat (**60**) (0.15 mol, 19.5 g) wurde über Nacht mit Wasser (150 mL) und NaOH (0.16 mol, 6.30 g) gerührt. In einem Scheidetrichter wurde mit Diethylether (150 mL) versetzt und die wässrige Phase wurde mit Ammoniumsulfat gesättigt.

Schwefelsäure (4.2 mL) in Wasser (50 mL) wurde zugegeben und die Phasen wurden separiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck bei Temperaturen unter 30 °C entfernt. Das restliche Lösemittel wurde unter Hochvakuum entfernt, es wurde die Säure **61** mit einer Ausbeute von 14% (0.02 mol, 2.05 g) als kristalliner Feststoff erhalten.

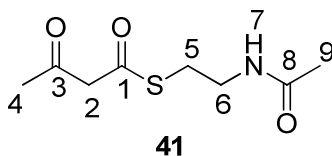
$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 3.53 (s, 2H, H-2), 2.32 (s, 3H, H-4).



***S*-(Acetoacetyl)-*N*-acetylcysteamin (**41**)**

N-Acetylcysteamin (**57**) (3.89 mmol, 0.46 g) in Toluol (8 mL) wurde zu einer Lösung aus 2,2,6-Trimethyl-1,3-dioxin-4-on (**63**) (5.56 mmol, 0.80 mg) ebenfalls in Toluol (30 mL) gegeben. Die Mischung wurde für sieben Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , EtOAc, R_f = 0.23). Es wurden 0.37 g (1.82 mmol, 32%) des Thioesters **41** in Form eines gelblichen Feststoffs erhalten.

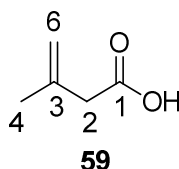
$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 6.01 (brs, 1H, H-7), 3.68 (s, 2H, H-2), 3.47 – 3.40 (m, 2H, H-6), 3.07 (t, 3J = 6.6 Hz, 2H, H-5), 2.24 (s, 3H, H-4), 1.95 (s, 3H, H-9); $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 200.1 (C-1), 192.5 (C-3), 170.7 (C-8), 100.1 (C-2), 58.2 (C-4), 39.4 (C-6), 29.4 (C-5), 23.3 (C-9); MS: (ESI, 10 eV, m/z (%)) 226.0 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{SH}$ 204.0689 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gemessen: 204.0689 $[\text{M}+\text{H}]^+$; IR [cm^{-1}]: 3293, 1719, 1655, 1543, 1360, 1289, 1090, 980.



3-Methyl-3-butensäure (59)

Zu einer Lösung aus 3-Methyl-3-buten-1-ol (**58**) (69.71 mmol, 6.00 g) in Aceton (200 mL) wurde bei 0 °C tropfenweise Jones-Reagenz (36.5 mL, 97.5 mmol) zugegeben. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, danach wurde die Reaktion durch Zugabe von Isopropanol (20 mL) beendet. Es wurde Wasser (50 mL) zugegeben und die organischen Lösemittel wurden unter vermindertem Druck entfernt. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether (3x50 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (3x50 mL) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit verdünnter, wässriger Salzsäure ($c = 2\text{ M}$) auf pH 3 angesäuert und erneut mit Diethylether (1x50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (1x50 mL) und gesättigter Natriumchloridlösung (1x50 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels einer Vakuumdestillation (5.3×10^{-3} bar, Sdp.: 45-47 °C) aufgereinigt. Es wurde 50% (34.86 mmol, 3.49 g) Säure **59** erhalten.

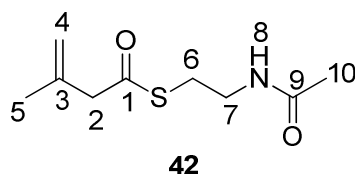
$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 4.98 (s, 1H, H-6_a), 4.87 (s, 1H, H-6_b), 3.06 (s, 2H, H-2), 1.82 (s, 3H, H-4).

**S-(3-Methyl-3-buten)-N-acetylcysteamin (42)**

Eine Lösung aus 3-Methyl-3-butensäure (5.00 mmol, 0.50 g) in Dichlormethan (15 mL) wurde für 15 Minuten auf 0 °C gekühlt. 4-DMAP (1.00 mmol, 0.12 g), EDC (6.00 mmol, 1.15 g) und *N*-Acetylcysteamin (**57**) (6.00 mmol, 0.72 g) wurden zugegeben, und die Lösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Es wurde mit gesättigter Ammoniumchloridlösung (10 mL) gestoppt und mit Dichlormethan (3x15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde erst säulenchromatographisch (SiO_2 , EtOAc, $R_f = 0.40$) und dann per HPLC (Knauer

Eurospher II-5 C-18, 5 μm , 4.0 mm x 250 mm, ACN/H₂O; 30/70; v/v, R_t = 9.54 min) aufgereinigt und der Thioester **42** wurde mit einer Ausbeute von 2% (0.1 mmol, 0.02 g) erhalten.

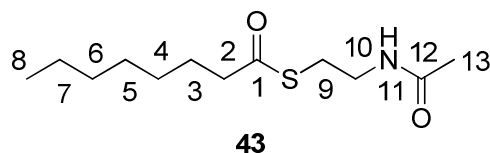
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 5.84 (brs, 1H, H-8), 4.98 - 4.97 (m, 1H, H-4_a), 4.91 - 4.91 (m, 1H, H-4_b), 3.44 (dt, ³ J = 6.1 Hz, ³ J = 6.1 Hz, 2H, H-7), 3.27 (d, ⁴ J = 1.0 Hz, 2H, H-2), 3.03 (t, ³ J = 6.4 Hz, 2H, H-6), 1.97 (s, 3H, H-10), 1.79 (s, 3H, H-5); ¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 198.0 (C-1), 170.6 (C-9), 138.4 (C-3), 116.4 (C-4), 52.9 (C-2), 39.9 (C-7), 28.9 (C-6), 23.4 (C-10), 22.6 (C-5); MS: (ESI, 10 eV, m/z (%)): 224.1 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): C₉H₁₅NO₂SNa 224.0716 [M+Na]⁺; gemessen: 224.0715 [M+Na]⁺; IR [cm⁻¹] ν_{max} : 3291, 1651, 1545, 1375, 1287, 1001, 595.



S-Octanoyl-N-acetylcysteamine (43)

Eine Lösung aus Oktansäure (6.94 mmol, 1.00 g) in Dichlormethan (20 mL) wurde für 15 Minuten auf 0 °C gekühlt. 4-DMAP (kat. Mengen), EDC (8.33 mmol, 1.60 g) und N-Acetylcysteamine (**57**) (8.33 mmol, 0.99 g) wurden zugegeben, und die Lösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Es wurde mit gesättigter Ammoniumchloridlösung (10 mL) gestoppt und mit Dichlormethan (3x20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, EtOAc, R_f = 0.50) und es wurden 82% (5.71 mmol, 1.40 g) Ausbeute des Thioesters **43** als weißer, kristalliner Feststoff erhalten.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 6.07 (brs, 1H, H-11), 3.40 (td, ³ J = 6.3 Hz, ³ J = 6.3 Hz, 2H, H-10), 2.99 (t, ³ J = 6.5 Hz, 2H, H-9), 2.62 - 2.48 (m, 2H, H-2), 1.94 (s, 3H, H-13), 1.63 (m, 2H, H-3), 1.24 (m, 8H, H-4, H-5, H-6, H-7), 0.85 (t, ³ J = 6.8 Hz, 3H, H-8).

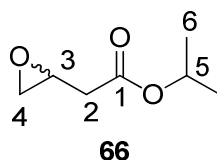


4.2.2 Synthese von (3*S*)-3-Methoxy-5-methylhex-5-en-säureacetamidoethylthioester (44b)

Isopropyl-3,4-epoxybutansäureester (66)

Zu einer Lösung aus 2-Propanol (0.31 mol, 24 mL) in Triethylamin (150 mL) wurde bei 0 °C langsam *trans*-Crotonylchlorid (**64**) zugegeben (0.21 mol, 20 mL). Die Mischung wurde drei Stunden bei r.t. gerührt und dann mit halbkonzentrierter Salzsäure ($c = 6$ M) gestoppt und mit Diethylether (3x70 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser (1x50 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt **65** wurde in Dichlormethan (300 mL) gegeben und bei 0 °C mit 75% *m*CPBA (0.27 mol, 63.00 g) versetzt. Es wurde über Nacht bei r.t. gerührt, filtriert und das Filtrat mit verdünnter, wässriger NaOH ($c = 2$ M, 140 mL) gewaschen und mit Dichlormethan (3x100 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser (1x100 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde im Vakuum destilliert (40 °C, 8×10^{-3} bar). Als Produkt **66** wird ein farbloses Öl mit einer Ausbeute von 42% (0.09 mol, 12.50 g) erhalten.

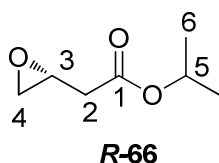
$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 4.97 (h, $^3J = 6.3$ Hz, 1H, H-5), 3.21 – 3.16 (m, 1H, H-3), 2.75 – 2.39 (m, 4H, H-2, H-4), 1.18 (d, $^3J = 6.3$ Hz, 6H, H-6, H-6').



(3*R*)-Isopropyl-3,4-epoxybutansäureester (*R*-66)

In einem Kolben wurde (*R,R*)-(-)-*N,N'*-bis(3,5-di-*tert*-butylsalicyliden)-1,2-cyclohexandiamincobalt (II) (**72**) (0.12 mmol, 75 mg) in Dichlormethan (0.5 mL)

vorgelegt. Essigsäure (0.50 mmol, 30 mg) wurde zugegeben und es wurde zehn min bei r.t. gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Bei 0 °C wurde mit Diethylether (20 mL) versetzt, und es wurden Isopropyl-3,4-epoxybutansäureester **66** (25.00 mmol, 3.60 g) und Wasser (14.00 mmol, 0.25 mL) tropfenweise zugegeben. Es wurde über Nacht bei r.t. gerührt, das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt über eine Vakuumdestillation aufgereinigt. Das Epoxid **R-66** wurde mit 36% (9.02 mmol, 1.30 g) Ausbeute in Form einer farblosen Flüssigkeit erhalten. Der Enantiomerenüberschuss wurde mittels analytischer HPLC bestimmt und lag bei 99.

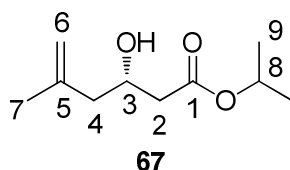


(3S)-Isopropyl-3-hydroxy-5-methylhex-5-ensäureester (67)

Zu Magnesiumspänen (13.20 mmol, 0.32 g) in Tetrahydrofuran (15 mL) wurde langsam 2-Brompropen (13.47 mmol, 1.63 g, 1.20 mL) getropft. Das Reaktionsgemisch wurde für zehn Minuten gerührt und dann mit Hilfe einer Spritze vorsichtig bei -60 °C zu Kupferiodid (13.31 mmol, 2.50 g) in Diethylether (15 mL) gegeben. Es wurde für zehn Minuten gerührt, dann wurde (3R)-Isopropyl-3,4-epoxybutansäureester **R-66** (9.02 mmol, 1.30 g) in ein Diethylether/Tetrahydrofurangemisch (1/1, v/v, 6 mL) bei ebenfalls -60 °C zugegeben. Nach weiteren zehn Minuten wurde mit Ammoniumchloridlösung (10 mL) gestoppt und die wässrige Phase mit Diethylether (3x10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (1x10 mL) und gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung (1x10 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, EtOAc/Cyclohexan, 1/8, v/v, R_f = 0.5), das ungesättigte Produkt **67** wurde als gelbliche Flüssigkeit mit 60% (5.37 mmol, 1.00 g) Ausbeute erhalten.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 4.98 (h, ³J = 6.3 Hz, 1H, H-8), 4.71 - 4.79 (m, 2H, H-6), 4.14 - 4.07 (m, 1H, H-3), 2.44 - 2.06 (m, 4H, H-2, H-4), 1.69 (s, 3H, H-7), 1.18 (d, ³J = 6.3 Hz, 6H, H-9, H-9'); ¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 172.1

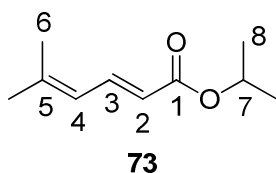
(C-1), 141.9 (C-5), 113.4 (C-6), 68.0 (C-8), 65.9 (C-3), 45.0 (C-4), 41.1 (C-2), 22.4 (C-7), 21.7 (C-9, C-9').



(E)-Isopropyl-5-methylhexa-2,4-dienoat (73)

(3S)-Isopropyl-3-hydroxy-5-methylhex-5-ensäureester (**67**) (5.37 mmol, 1.00 g) wurde in THF (10 mL) gelöst. Bei 0 °C wurde Natriumhydrid (15.84 mmol, 0.38 g) zugegeben und es wurde für 15 Minuten gerührt. Dann wurde Iodmethan (10.74 mmol, 1.52 g) zugegeben und es wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktion wurde bei 0 °C mit Ammoniumchloridlösung (7 mL) gestoppt, mit Diethylether (3x5 mL) extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, EtOAc/Cyclohexan, 1/5, v/v, R_f = 0.29), und das α,β -ungesättigte Produkt **73** wurde mit einer Ausbeute von 38% (2.02 mmol, 0.34 g) erhalten.

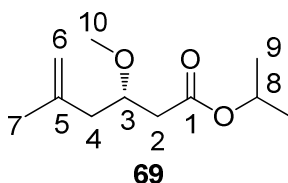
¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 7.53 (dd, ³J = 15.1 Hz, ³J = 11.6 Hz, 1H, H-3), 5.99 – 5.94 (m, 1H, H-4), 5.73 (d, ³J = 15.3 Hz, 1H, H-2), 5.07 (h, ³J = 6.3 Hz, 1H, H-7), 1.88 (d, ⁴J = 0.6 Hz, 3H, H-6)* 1.86 (s, 3H, H-6')*, 1.26 (d, ³J = 6.3 Hz, 6H, H-8, H-8'); ¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 167.4 (C-1), 146.1 (C-3), 140.9 (C-5), 123.9 (C-4), 119.3 (C-2), 67.4 (C-7), 26.7 (C-6), 22.1 (C-8, C-8'), 19.1 (C-6'); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)) 191.1 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₁₀H₁₆O₂Na 191.1043 [M+Na]⁺; gemessen: 191.1035 [M+Na]⁺; IR [cm⁻¹] ν_{max} : 2978, 1719, 1375, 1262, 1177, 1145, 1105, 982.



(3S)-Isopropyl-3-methoxy-5-methylhex-5-ensäureester (69)

Zu (3S)-Isopropyl-3-hydroxy-5-methylhex-5-ensäureester (**67**) (3.60 mmol, 0.67 g) in Dichlormethan (5 mL) wurden 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylpyridin (7.20 mmol, 1.48 g) und Methyltriflat (7.20 mmol, 1.18 g) gegeben. Es wurde für 48 Stunden gerührt, dann wurde Diethylether (5 mL) zugegeben und filtriert. Nach Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck wurde das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, EtOAc/Cyclohexan, 1/5, v/v, R_f = 0.4). Das methylierte Produkt **69** wurde mit einer Ausbeute von 30% (1.08 mmol, 0.22 g) erhalten.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 5.02 (h, ³J = 6.2 Hz, 1H, H-8), 4.81 – 4.80 (m, 1H, H-6_a), 4.75 – 4.74 (m, 1H, H-6_b), 3.80 (tt, ³J = 6.1 Hz, ³J = 6.5 Hz, 1H, H-3), 3.35 (s, 3H, H-10), 2.43 – 2.42 (m, 2H, H-2), 2.34 (ddd, ²J = 13.9 Hz, ³J = 6.1 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 1H, H-4_a), 2.15 (ddd, ²J = 13.9 Hz, ³J = 6.5 Hz, ⁴J = 0.8 Hz, 1H, H-4_b), 1.76 (s, 3H, H-7), 1.24 (d, ³J = 6.2 Hz, 3H, H-9), 1.22 (d, ³J = 6.2 Hz, 3H, H-9'); ¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 171.4 (C-1), 142.3 (C-5), 113.4 (C-6), 76.5 (C-3), 67.9 (C-8), 57.2 (C-10), 42.4 (C-4), 39.9 (C-2), 22.9 (C-7), 22.0 (C-9), 21.9 (C-9'); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)) 223.1 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₁₁H₂₀NO₃Na 223.1305 [M+Na]⁺; gemessen: 223.1306 [M+Na]⁺; IR [cm⁻¹] ν_{max}: 2980, 2933, 1729, 1374, 1182, 1103, 1015, 891.

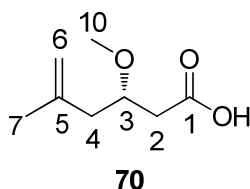


(3S)-3-Methoxy-5-methylhex-5-ensäure (70)

(3S)-Isopropyl-3-methoxy-5-methylhex-5-ensäureester (**69**) (1.08 mmol, 0.22 g) wurde in Ethanol (3.5 mL) gelöst und mit verdünnter, wässriger Natriumhydroxidlösung (*c* = 1 M) auf einen pH-Wert von 12 gebracht. Es wurde über Nacht bei r.t. gerührt, am nächsten Tag erfolgte die Aufarbeitung durch Ansäuern der Lösung mit wässriger, verdünnter Salzsäure (*c* = 1 M) auf einen pH-Wert von 2, die wässrige Phase wurde mit Diethylether (5x5 mL) extrahiert, die organische Phase mit Wasser (1x5 mL) und gesättigter wässriger Natriumchloridlösung (1x5 mL) gewaschen, es wurde über

Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Säure **70** wurde mit 87 mg (0.55 mmol, 51%) Ausbeute in Form einer farblosen Flüssigkeit erhalten und ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 4.84 (brs, 1H, H-6_a), 4.76 (brs, 1H, H-6_b), 3.85 – 3.79 (m, 1H, H-3), 3.40 (s, 3H, H-10), 2.56 (dd, $^2J = 15.8$ Hz, $^3J = 4.8$ Hz, 1H, H-2_a), 2.50 (dd, $^2J = 15.8$ Hz, $^3J = 7.5$ Hz, 1H, H-2_b), 2.40 (dd, $^2J = 13.9$ Hz, $^3J = 5.8$ Hz, 1H, H-4_a), 2.17 (dd, $^2J = 13.9$ Hz, $^3J = 7.2$ Hz, 1H, H-4_b), 1.77 (s, 3H, H-7); $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 177.4 (C-1), 141.9 (C-5), 113.8 (C-6), 76.2 (C-3), 57.2 (C-10), 42.0 (C-4), 39.1 (C-2), 22.9 (C-7); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)) 157.1 (100) $[\text{M-H}]^-$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_3$ 157.0870 $[\text{M-H}]^-$; gemessen: 157.0865 $[\text{M-H}]^-$; IR $[\text{cm}^{-1}]$ ν_{max} : 2934, 1707, 1442, 1294, 1187, 1103, 892.

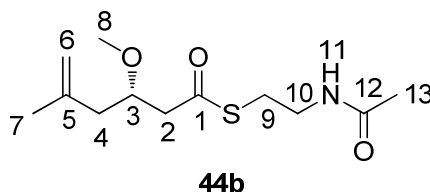


(3S)-3-Methoxy-5-methylhex-5-en-säureacetamidoethylthioester (**44b**)

(3S)-3-Methoxy-5-methylhex-5-ensäure (**70**) (0.63 mmol, 0.10 g) wurde in Dichlormethan (10 mL) gegeben und für 15 min auf 0 °C gekühlt. *N*-Acetylcysteamin (**57**) (0.76 mmol, 0.10 g), 4-DMAP (kat. Mengen) und EDC (0.76 mmol, 0.15 g) wurden langsam zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktion wurde am nächsten Tag mit gesättigter wässriger Ammoniumchloridlösung (7 mL) beendet, die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (3x10 mL) extrahiert und die organische Phase mit Wasser (1x10 mL) gewaschen. Es wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , EtOAc, $R_f = 0.24$), erhalten wurden 110 mg des Thioesters **44b** (0.42 mmol, 67%).

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 5.85 (brs, 1H, H-11), 4.83 (s, 1H, H-6_a), 4.75 (s, 1H, H-6_b), 3.86 (m, 1H, H-3), 3.44 (dt, $^3J = 6.3$ Hz, $^3J = 6.3$ Hz, 2H, H-10), 3.35 (s, 3H, H-8), 3.04 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 2H, H-9), 2.77 (dd, $^2J = 15.2$ Hz, $^3J = 7.1$ Hz, 1H, H-2_a), 2.70 (dd, $^2J = 15.0$ Hz, $^3J = 4.9$ Hz, 1H, H-2_b), 2.36 (dd, $^2J = 13.8$ Hz, $^3J = 6.8$ Hz, 1H,

H-4_a), 2.14 (dd, $^2J = 13.9$ Hz, $^3J = 7.0$ Hz, 1H, H-4_b), 1.96 (s, 3H, H-13), 1.75 (s, 3H, H-7); ^{13}C -NMR: (100 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 198.3 (C-1), 170.4 (C-12), 141.0 (C-5), 113.8 (C-6), 76.5 (C-3), 57.3 (C-8), 48.6 (C-4), 42.1 (C-2), 39.8 (C-10), 28.8 (C-9), 23.3 (C-13), 22.9 (C-7); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 282.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{SNa}$ 282.1134 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 282.1131 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR [cm^{-1}] ν_{max} : 3293, 2933, 1685, 1651, 1548, 1288, 1104, 9960.

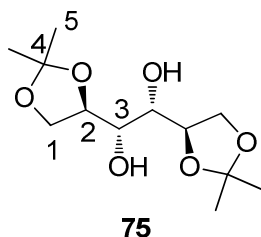


4.2.3 Synthese von *S*-(2-Acetamidoethyl)-2-((2*S*,3*S*)-2-hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5 enamido)-ethanthioat (45b) und versuchte Synthese von *S*-(2-Acetamidoethyl)-2-((2*S*,3*S*)-2,3-dihydroxy-5-methylhex-5 enamido)-ethanthioat (45a)

1,2:5,6-Diisopropyliden-*D*-mannitol (75)

Zu *D*-Mannitol (**74**) (0.41 mol, 75.00 g) wurden Dimethoxyethan (180 mL), 2,2-Dimethoxypropan (0.98 mol, 120 mL) und Zinn(II)chlorid (0.4 mmol, 0.075 g) gegeben und die Mischung wurde zum Sieden erhitzt bis eine klare Lösung entstand. Es wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und Pyridin (1.14 mmol, 0.09 mL) zugegeben. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der entstandene Feststoff in Dichlormethan (540 mL) gelöst und die Rückstände abfiltriert. Das Lösemittel wurde erneut entfernt und man erhielt die gewünschte Substanz **75** mit einer Ausbeute von 54% (0.22 mol, 58.00 g).

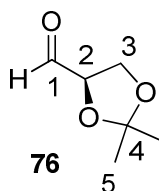
^1H -NMR: (400 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 4.19 – 4.14 (m, 4H, H-1, H-1'), 3.95 (dd, $^3J = 8.4$ Hz, $^3J = 5.7$ Hz, 2H, H-2, H-2'), 3.73 (m, 2H, H-3, H-3'), 1.40 (s, 6H, H-5, H-5')*, 1.34 (s, 6H, H-5'', H-5''')*.



2,3-*O*-(Isopropyliden)-*D*-glyceraldehyd (**76**)

1,2:5,6-Diisopropyliden-*D*-mannitol (**75**) (0.13 mol, 33 g) wurde in Dichlormethan (300 mL) gelöst. Gesättigte wässrige Natriumhydrogencarbonatlösung (11.9 mL) wurde zugegeben, während die Temperatur unter 25 °C gehalten wurde. Natriumperiodat wurde zugegeben während die Temperatur unter 30 °C gehalten wurde und die Mischung wurde für zwei Stunden bei unter 30 °C gerührt. Der verbleibende Feststoff wurde abfiltriert, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Destillation im Vakuum aufgereinigt (8×10^{-3} mbar, 80 °C). Es wurden 16.35 g (0.13 mol, 50%) Aldehyd **76** in Form eines farblosen Öls erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 9.68 (d, $^4J = 1.8$ Hz, 1H, H-1), 4.35 (ddd, $^3J = 4.8$ Hz, $^3J = 7.3$ Hz, $^4J = 1.81$ Hz, 1H, H-2), 4.16 – 4.11 (dd, $^2J = 8.8$ Hz, $^3J = 7.4$ Hz, 1H, H-3_a), 4.08 – 4.04 (dd, $^2J = 8.8$ Hz, $^3J = 4.8$ Hz, 1H, H-3_b), 1.47 (s, 3H, H-5)*, 1.40 (s, 3H, H-5')*.

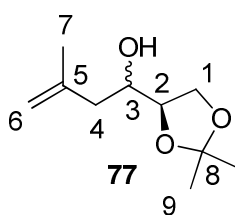


(2*R*)-1-(2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-3-methylbut-3-en-1-ol (**77**)

Magnesium (66.24 mmol, 1.61 g) wurde in Tetrahydrofuran (88 mL) vorgelegt. Es wurde 1 mL β -Methallylchlorid zugetropft und nach dem Anspringen der Grignard-Reaktion wurden die übrigen 5.6 mL β -Methallylchlorid langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf -78 °C gekühlt, in THF (54 mL) gelöster 2,3-*O*-Isopropyliden-*D*-glyceraldehyd (**76**) (46.10 mmol, 6.00 g) wurde langsam zugetropft. Bei r.t. wurde die Reaktionsmischung über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde

erneut auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und mit gesättigter wässriger Ammoniumchloridlösung (40 mL) beendet. Es wurde mit Diethylether (3x70 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Als Produkt **77** wurde ein farbloses Öl mit einer Ausbeute von 67% (30.78 mmol, 5.73 g) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 4.87 (s, 2H, H-6_a), 4.79 (s, 2H, H-6_b), 4.03 – 3.68 (m, 8H, H-1, H-2, H-3), 2.30 – 2.06 (m, 4H, H-4), 1.76 (s, 6H, H-7), 1.43 und 1.41 (s, 3H, H-9)*, 1.35 und 1.35 (s, 3H, H-9)*.



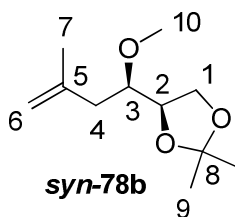
(2R,3S)-4-(1-Methoxy-3-methylbut-3-enyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (*anti*-78b),
(2R,3R)-4-(1-Methoxy-3-methylbut-3-enyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (*syn*-78b)

(2R)-1-(2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-3-methylbut-3-en-1-ol (**77**) (30.78 mmol, 5.73 g) wurde in THF (55 mL) gelöst und auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Zu der Reaktionsmischung wurde Natriumhydrid (55.54 mmol, 1.33 g, 60 % Dispersion in Mineralöl) gegeben und für 15 Minuten gerührt. Nach der Zugabe von Methyljodid (61.51 mmol, 4.33 g) wurde die Reaktionslösung auf r.t. erwärmt und über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde mit gesättigter wässriger Ammoniumchloridlösung (30 mL) gestoppt, mit Diethylether (3x40 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , Cyclohexan/Aceton 70/1 \rightarrow 40/1, v/v, $R_{f,anti} = 0.44$, $R_{f,syn} = 0.27$) aufgereinigt. Das methylierte Produkt **78b** wurde als farbloses Öl mit einer Ausbeute von 73% (total, 22.38 mmol, 4.48 g, davon *anti*: 41%, *syn*: 32%) erhalten.

syn-Isomer:

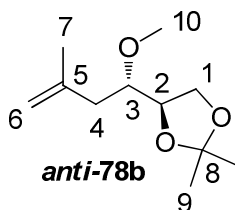
$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 4.78 (s, 1H, H-6_a), 4.74 (s, 1H, H-6_b), 4.12 (dt, $^3J = 6.5\text{ Hz}$, $^3J = 7.3\text{ Hz}$, 1H, H-2), 3.95 (dd, $^2J = 8.2\text{ Hz}$, $^3J = 6.5\text{ Hz}$, 1H, H-1_a), 3.64 (dd, $^2J = 8.0\text{ Hz}$, $^3J = 7.4\text{ Hz}$, 1H, H-1_b), 3.42 (s, 3H, H-10), 3.39 – 3.31 (m, 1H, H-3), 2.13 (d, $^3J = 6.0\text{ Hz}$, 2H, H-4), 1.75 (s, 3H, H-7), 1.40 (s, 3H, H-9)*, 1.32 (s, 3H, H-9)*;
 $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 142.4 (C-5), 113.2 (C-6), 109.4 (C-8), 80.6

(C-10), 77.8 (C-2), 66.0 (C-3), 58.6 (C-1), 38.8 (C-4), 26.7 (C-7), 25.5 (C-9)*, 23.0 (C-9')*.



anti-Isomer:

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 4.85 (s, 1H, H-6_a), 4.81 (s, 1H, H-6_b), 4.07 – 3.98 (m, 2H, H-1_a, H-2), 3.92 – 3.85 (m, 1H, H-1_b), 3.47 – 3.41 (m, 1H, H-3), 3.42 (s, 3H, H-10), 2.25 – 2.23 (m, 2H, H-4), 1.82 (s, 3H, H-7), 1.46 (s, 3H, H-9)*, 1.37 (s, 3H, H-9')*; $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 142.6 (C-5), 113.2 (C-6), 109.3 (C-8), 80.0 (C-10), 77.8 (C-2), 66.0 (C-3), 59.1 (C-1), 39.7 (C-4), 26.7 (C-7), 25.6 (C-9)*, 23.6 (C-9')*.

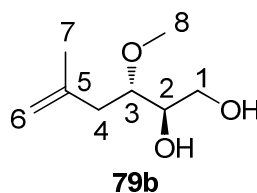


(2R,3S)-3-Methoxy-5-methylhex-5-en-1,2-diol (79b)

(2R,3S)-4-(1-Methoxy-3-methylbut-3-enyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (**anti-78b**) (1.84 g, 9.05 mmol) wurde in Essigsäure/Wasser (20 mL, 4/1) gelöst und über Nacht bei r.t. gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , Cyclohexan /Aceton, 5/1, v/v, R_f = 0.10) aufgereinigt. Es wurden 1.47 g (7.82 mmol, 85%) des entschützten Diols **79b** in Form einer farblosen Flüssigkeit erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 4.82 (s, 1H, H-6_a), 4.78 (s, 1H, H-6_b), 3.80 – 3.76 (m, 1H, H-2), 3.69 – 3.66 (m, 2H, H-1), 3.53 (ddd, 3J = 6.7 Hz, 3J = 6.7 Hz, 3J = 4.0 Hz, 1H, H-3), 3.41 (s, 3H, H-10), 2.41 (dd, 2J = 14.2 Hz, 3J = 6.7 Hz, 1H, H-4_a), 2.21 (ddd, 2J = 14.3 Hz, 3J = 6.5 Hz, 4J = 0.8 Hz, 1H, H-4_b), 1.77 (s, 3H, H-7). $^{13}\text{C-NMR}$:

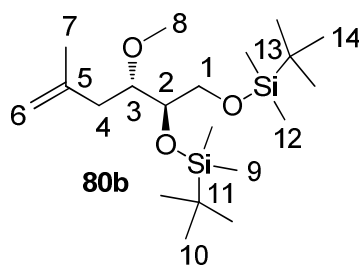
(100 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 142.3 (C-5), 113.5 (C-6), 82.2 (C-8), 72.3 (C-2), 63.2 (C-3), 58.6 (C-1), 38.9 (C-4), 22.9 (C-7).



(2*R*,3*S*)-1,2-Di-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-3-methoxy-5-methylhex-5-en (80b)

(2*R*,3*S*)-3-Methoxy-5-methylhex-5-en-1,2-diol (**79b**) (7.82 mmol, 1.47 g) wurde in DMF (30 mL) gelöst. Zur Reaktionslösung wurden *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (20.37 mmol, 3.07 g) und Imidazol (23.51 mmol, 1.60 g) gegeben und es wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser (20 mL) versetzt, mit Diethylether (3x20 mL) extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO₂, Cyclohexan/Aceton, 40/1, v/v, R_f = 0.93) als mobile Phase gereinigt. Das geschützte Produkt **80b** wurde mit 2.30 g (5.92 mmol, 76%) Ausbeute als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 4.74 (s, 1H, H-6_a), 4.71 (s, 1H, H-6_b), 3.75 (td, ³J = 5.8 Hz, ³J = 2.7 Hz, 1H, H-2), 3.52 (d, ³J = 5.8 Hz, 2H, H-1), 3.42 - 3.37 (m, 1H, H-3), 3.32 (s, 3H, H-8), 2.15 (d, ³J = 6.6 Hz, 2H, H-4), 1.72 (s, 3H, H-7), 0.85 (s, 9H, H-10, H-10', H-10''), 0.84 (s, 9H, H-14, H-14', H-14''), 0.03 (s, 6H, H-9, H-9''), 0.02 (s, 6H, H-12, H-12''); ¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 143.5 (C-5), 112.0 (C-6), 81.1 (C-8), 74.3 (C-2), 64.5 (C-3), 58.1 (C-1), 38.5 (C-4), 26.0 (C-10, C-10', C-10''), 25.9 (C-14, C-14', C-14''), 22.9 (C-7), 18.3 (C-11), 18.2 (C-13), -4.5 (C-9), -4.7 (C-9'), -5.3 (C-12), -5.4 (C-12'').

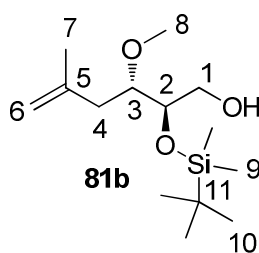


(2*R*,3*S*)-2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-3-methoxy-5-methylhex-5-en-1-ol (81b)

(2*R*,3*S*)-1,2-Di-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-3-methoxy-5-methyl-hex-5-en (80b)

(5.92 mmol, 2.30 g) wurde in THF (20 mL) gelöst. Zur Reaktionslösung werden Pyridin (3.08 g, 38.94 mmol, 3.15 mL) und HF-Pyridin-Lösung (65-70% HF in Pyridin, 0.52 mL) gegeben und es wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Diethylether (15 mL) versetzt und mit verdünnter wässriger Salzsäure ($c = 0.5\text{N}$) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether (3x20 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger CuSO_4 -Lösung (20 mL) und Wasser (20 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO_2 , Cyclohexan/Aceton, 20/1, v/v, $R_f = 0.24$) aufgereinigt. Der primäre Alkohol **81b** wurde mit 59% Ausbeute (3.50 mmol, 0.96 g) als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 4.79 (s, 1H, H-6_a), 4.78 (s, 1H, H-6_b), 3.71 – 3.59 (m, 3H, H-1, H-2), 3.42 (s, 3H, H-8), 3.41 – 3.37 (m, 1H, H-3), 2.25 (dd, $^2J = 14.4\text{ Hz}$, $^3J = 4.2\text{ Hz}$, 1H, H-4_a), 2.17 (dd, $^2J = 14.4\text{ Hz}$, $^3J = 8.5\text{ Hz}$, $^4J = 0.6\text{ Hz}$, 1H, H-4_b), 1.76 (s, 3H, H-7), 0.89 (s, 9H, H-10, H-10', H-10''), 0.08 (s, 6H, H-9, H-9'); $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 143.1 (C-5), 112.9 (C-6), 82.1 (C-8), 74.5 (C-2), 64.1 (C-3), 59.2 (C-1), 40.4 (C-4), 26.0 (C-7), 22.9 (C-10, C-10', C-10''), 18.3 (C-11), -4.3 (C-9)*, -4.2 (C-9').

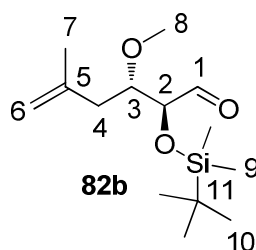


(2*S*,3*S*)-2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-3-methoxy-5-methylhex-5-enal (82b)

Zu einer Lösung aus Oxalylchlorid (5.24 mmol, 0.46 mL) in Dichlormethan (20 mL) wurde bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ Dimethylsulfoxid (11.54 mmol, 0.82 mL) gegeben und es wurde für 15 Minuten gerührt. (2*R*,3*S*)-2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-3-methoxy-5-methylhex-5-en-1-ol (**81b**) (3.50 mmol, 0.96 g) in Dichlormethan (20 mL) wurde langsam zugegeben

und nach einer weiteren halben Stunde Triethylamin (17.83 mmol, 2.48 mL), wobei das Kältebad gegen ein Eisbad getauscht wurde. Es wurde für 20 Minuten gerührt, mit Dichlormethan (20 mL) und Wasser (20 mL) verdünnt, mit Dichlormethan (3x20 mL) extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Aldehyd **82b** wurde als gelbliche Flüssigkeit mit einer Ausbeute von 97% (3.40 mmol, 923 mg) erhalten und ohne weitere Aufarbeitung direkt weiter umgesetzt.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 9.57 (d, $^4J = 1.2$ Hz, 1H, H-1), 4.81-4.80 (m, 2H, H-6), 4.11 (dd, $^3J = 2.6$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz, 1H, H-2), 3.58 (td, $^3J = 7.0$ Hz, $^3J = 2.6$ Hz, 1H, H-3), 3.37 (s, 3H, H-8), 2.32 – 2.18 (m, 2H, H-4), 1.66 (s, 3H, H-7), 0.92 (s, 9H, H-10, H-10', H-10''), 0.07 (s, 3H, H-9)*, 0.05 (s, 3H, H-9'')*; $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 203.6 (C-1), 141.7 (C-5), 114.4 (C-6), 83.0 (C-8), 78.7 (C-2), 58.0 (C-3), 38.6 (C-4), 25.9 (C-7), 22.7 (C-10, C-10', C-10''), 18.3 (C-11), -4.7 (C-9)*, -4.8 (C-9'')*.

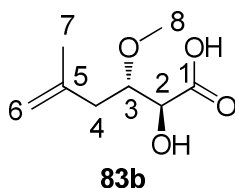


(2S,3S)-2-Hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-ensäure (83b)

Zu einer Lösung aus (2S,3S)-2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-3-methoxy-5-methylhex-5-enal (**82b**) (3.40 mmol, 923 mg) in *tert*-Butanol/Wasser (3.5/1, 75 mL) wurde bei 0 °C Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (6.12 mmol, 847 mg), 2-Methyl-2-buten (61.80 mmol, 32.14 mL einer 2 M Lösung in Tetrahydrofuran) und Natriumchlorit (8.34 mmol, 754 mg) gegeben. Es wurde für zwei Stunden bei r.t. gerührt, aufkonzentriert, mit Wasser (50 mL) verdünnt und mit wässriger verdünnter Salzsäure ($c = 1\text{M}$) auf einen pH-Wert von 2 gebracht. Es wurde mit Diethylether (5x50 mL) extrahiert, die organische Phase mit gesättigter wässriger Natriumchloridlösung (50 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO_2 ,

Cyclohexan/Aceton/Essigsäure, 1/1/0.01, v/v, $R_f = 0.34$) aufgereinigt. Die Säure **83b** wurde als farbloses Öl mit einer Ausbeute von 73% (2.48 mmol, 430 mg) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 4.83 (s, 1H, H-6_a), 4.80 (s, 1H, H-6_b), 4.41 (d, $^3J = 3.1$ Hz, 1H, H-2), 3.72 (ddd, $^3J = 7.9$ Hz, $^3J = 5.6$ Hz, $^3J = 3.1$ Hz, 1H, H-3), 3.44 (s, 3H, H-8), 2.39 (dd, $^2J = 14.5$ Hz, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, H-4_a), 2.24 (dd, $^2J = 14.5$ Hz, $^3J = 5.5$ Hz, 1H, H-4_b), 1.75 (s, 3H, H-7); $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 176.1 (C-1), 141.6 (C-5), 113.8 (C-6), 81.5 (C-8), 71.4 (C-2), 58.3 (C-3), 37.8 (C-4), 22.8 (C-7).

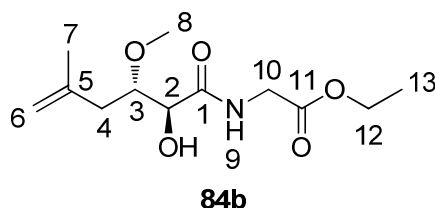


Ethyl-2-((2S,3S)-2-hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-enamido)acetat (**84b**)

Zu (2S,3S)-2-Hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-ensäure (**83b**) (0.43 g, 2.48 mmol) in DMF (10 mL) wurden bei 0 °C Glycinethylester*HCl (2.48 mmol, 0.35 g), 4-DMAP (kat. Mengen) und EDC*HCl (2.48 mmol, 0.48 g) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Es wurde mit gesättigter wässriger Ammoniumchloridlösung (7 mL) gestoppt, die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3x10 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (10 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , Ethylacetat/Cyclohexan, 1/1, v/v, $R_f = 0.5$) aufgereinigt. Der Thioester **84b** wurde mit einer Ausbeute von 35% (0.87 mmol, 0.23 g) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, DMSO-d_6 , RT) δ [ppm] = 8.17 (dd, $^3J = 5.9$ Hz, $^3J = 6.3$ Hz, 1H, H-9), 5.77 (d, $^3J = 5.2$ Hz, 1H, -OH), 4.78 (s, 1H, H-6_a), 4.66 (s, 1H, H-6_b), 4.24 (dd, $^3J = 5.2$ Hz, $^3J = 2.7$ Hz, 1H, H-2), 4.07 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, H-13), 3.87 (dd, $^2J = 17.2$ Hz, $^3J = 6.3$ Hz, 1H, H-10_a), 3.76 (dd, $^2J = 17.2$ Hz, $^3J = 5.9$ Hz, 1H, H-10_b), 3.58 (dt, $^3J = 9.5$ Hz, $^3J = 2.7$ Hz, 1H, H-3), 3.27 (s, 3H, H-8), 2.20 (dd, $^2J = 14.8$ Hz, $^3J = 9.5$ Hz, 1H, H-4_a), 2.07 – 2.02 (m, 1H, H-4_b), 1.66 (s, 3H, H-7), 1.17 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, H-13); $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 172.3 (C-1), 169.7 (C-11), 143.0 (C-5), 111.8 (C-6), 80.9 (C-8), 70.4 (C-2), 60.4 (C-12), 56.4 (C-3), 40.4 (C-10), 36.8 (C-4), 22.5 (C-7), 14.0 (C-13); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 282.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z):

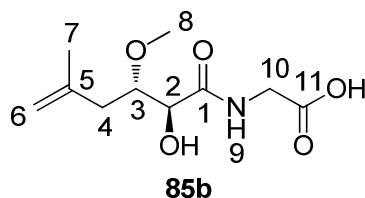
$\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_5\text{Na}$ 282.1312 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 282.1311 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR $[\text{cm}^{-1}]$ ν_{max} : 3371, 2936, 1740, 1651, 1529, 1197, 1153, 1104, 1023.



2-((2*S*,3*S*)-2-Hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-enamido)essigsäure (85b)

Zu Ethyl 2-((2*S*,3*S*)-2-Hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-enamido)acetat (**84b**) (0.73 mmol, 0.19 g) in einem Lösemittelgemisch aus Tetrahydrofuran/Ethanol/Wasser (2/2/1) wurde Lithiumhydroxid (18.25 mmol, 0.44 g) gegeben. Es wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Die erhaltene Säure **85** wurde ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt, die Ausbeute betrug 37% (0.27 mmol, 0.063 g).

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 7.55 (s, 1H, H-9), 4.79 (s, 1H, H-6_a), 4.75 (s, 1H, H-6_b), 4.47 (d, $^3J = 3.4$ Hz, 1H, H-2), 4.12 (dd, $^3J = 5.9$ Hz, $^2J = 18.3$ Hz, 1H, H-10_a), 4.01 (dd, $^2J = 18.3$ Hz, $^3J = 5.5$ Hz, 1H, H-10_b), 3.77 (dt, $^3J = 9.1$ Hz, $^3J = 3.6$ Hz, 1H, H-3), 3.41 (s, 3H, H-8), 2.29 (dd, $^2J = 14.7$ Hz, $^3J = 9.2$ Hz, 1H, H-4_a), 2.17 – 2.11 (m, 1H, H-4_b), 1.73 (s, 3H, H-7); $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 172.75 (C-1), 172.74 (C-11), 142.1 (C-5), 113.1 (C-6), 80.9 (C-8), 71.4 (C-2), 57.7 (C-3), 40.9 (C-10), 37.0 (C-4), 22.6 (C-7); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 230.1 (100) $[\text{M} - \text{H}]^-$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{NO}_5$ 230.1034 $[\text{M} - \text{H}]^-$; gemessen: 230.1033 $[\text{M} - \text{H}]^-$; IR $[\text{cm}^{-1}]$ ν_{max} : 3356, 2362, 1646, 1638, 1629, 1618, 1559, 1087.

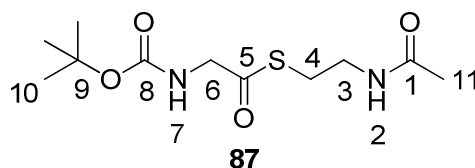


S-(2-Acetamidoethyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethanthioat (87)

2-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)essigsäure (**86**), 11.42 mmol, 2.00 g) wurde in Dichlormethan (40 mL) gegeben und auf 0 °C gekühlt. *N*-Acetylcysteamin (**57**)

(13.70 mmol, 1.64 g), 4-DMAP (kat. Mengen) und EDC·HCl (13.70 mmol, 2.74 g) wurden langsam zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktion wurde am nächsten Tag mit wässriger gesättigter Ammoniumchloridlösung (30 mL) gestoppt, die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (3x40 mL) extrahiert und die organische Phase mit Wasser (40 mL) gewaschen. Es wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, EtOAc, R_f = 0.32), erhalten wurden 3.05 g des Thioesters **87** in Form eines weißen Feststoffes (11.04 mmol, 97%).

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 6.45 (s, 1H, H-2), 5.57 (s, 1H, H-7), 3.96 (d, ³J = 6.1 Hz, 2H, H-6), 3.35 (td, ³J = 6.3 Hz, ³J = 6.3 Hz, 2H, H-3), 3.00 (t, ³J = 6.5 Hz, 2H, H-4), 1.91 (s, 3H, H-11), 1.41 (s, 9H, H-10, H-10', H-10''); ¹³C-NMR: (75 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 199.1 (C-5), 170.8 (C-1), 155.9 (C-8), 80.5 (C-9), 50.5 (C-6), 39.2 (C-3), 28.4 (C-4), 28.2 (C-10, C-10', C-10''), 23.1 (C-11).

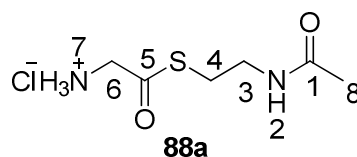


S-(2-Acetamidoethyl)-2-aminoethanthioathydrochlorid (88a)

S-(2-Acetamidoethyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethanthioat (**87**) (1.10 g, 3.98 mmol) in verdünnter Salzsäure (2 mL, *c* = 4 M in 1,4-Dioxan) wurde für zwei Stunden bei r.t. gerührt. Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck und Trocknung des Rückstands über Nacht unter Hochvakuum ergab 0.95 g S-(2-acetamidoethyl)-2-aminoethanthioat-Hydrochlorid (**88a**) (3.83 mmol, 96%) als weißen Feststoff.

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆, RT) δ [ppm] = 8.53 (s, 3H, H-7), 8.16 (t, ³J = 5.4 Hz, 1H, H-2), 4.06 (s, 2H, H-6), 3.22 (dt, ³J = 6.1 Hz, ³J = 6.6 Hz, 2H, H-3), 3.04 (t, ³J = 6.8 Hz, 2H, H-4), 1.80 (s, 3H, H-8); ¹³C-NMR: (75 MHz, DMSO-d₆, RT) δ [ppm] = 194.6 (C-1), 170.6 (C-5), 48.2 (C-6), 39.1 (C-3), 29.4 (C-4), 23.8 (C-8); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 199.1 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₆H₁₂N₂O₂SNa 199.0512

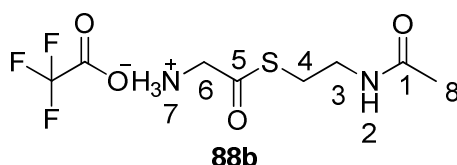
$[M+Na]^+$; gemessen: 199.0514 $[M + Na]^+$; IR[cm^{-1}] ν_{max} : 2853, 2444, 1685, 1545, 1392, 1081, 962, 870, 594.



***S*-(2-Acetamidoethyl)-2-aminoethanthioat (88b)**

S-(2-Acetamidoethyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethanthioat (**87**) (3.62 mmol, 1.00 g) wurde über Nacht bei Raumtemperatur in Trifluoressigsäure (5 mL) gerührt. Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck und Trocknung des Rückstands über Nacht unter Hochvakuum ergab 860 mg *S*-(2-Acetamidoethyl)-2-aminoethanthioat-Trifluoracetat (**88b**) (2.97 mmol, 82%).

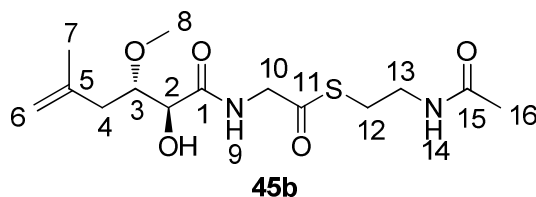
$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, DMSO- d_6 , RT) δ [ppm] = 8.34 (s, 3H, H-7), 8.08 (s, 1H, H-2), 4.10 (s, 2H, H-6), 3.22 (dt, $^3J = 6.5$ Hz, $^3J = 6.5$ Hz, 2H, H-3), 3.04 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, H-4), 1.80 (s, 3H, H-8).



***S*-(2-Acetamidoethyl)-2-((2*S*,3*S*)-2-hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5 enamido)-ethanthioat (45b)**

(2*S*,3*S*)-2-Hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-ensäure (**83b**) (0.57 mmol, 100 mg) wurde in DMF (5 mL) gegeben und für 15 Minuten auf 0 °C gekühlt. *S*-(2-Acetamidoethyl)-2-aminoethanthioathydrochlorid (**88a**) (0.68 mmol, 170 mg), 4-DMAP (1.43 mmol, 175 mg) und EDC*HCl (0.68 mmol, 134 mg) wurden langsam zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktion wurde am nächsten Tag mit gesättigter wässriger Ammoniumchloridlösung (3 mL) beendet, die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (3x7 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (7 mL) gewaschen. Es wurde über

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 7.35 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H, H-9), 5.86 (s, 1H, H-14), 4.83 (brs, 1H, H-6_a), 4.80 (s, 1H, H-6_b), 4.43 (d, ³J = 4.2 Hz, 1H, H-2), 4.23 (d, ³J = 6.1 Hz, 2H, H-10), 3.76 (ddd, ³J = 9.0 Hz, ³J = 4.2 Hz, ³J = 3.5 Hz, 1H, H-3), 3.46-3.41 (m, 2H, H-12), 3.44 (s, 3H, H-8), 3.08 (t, ³J = 6.4 Hz, 2H, H-13), 2.32 (ddd, ²J = 14.6 Hz, ³J = 9.0 Hz, ⁴J = 0.6 Hz, 1H, H-4_a), 2.23 (dd, ²J = 14.7 Hz, ³J = 3.5 Hz, 1H, H-4_b), 1.97 (s, 3H, H-16), 1.77 (s, 3H, H-7); ¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 196.9 (C-11), 171.8 (C-1), 170.6 (C-15), 142.2 (C-5), 113.2 (C-6), 80.5 (C-8), 71.2 (C-2), 57.7 (C-3), 48.9 (C-13), 39.4 (C-10), 37.1 (C-4), 28.6 (C-12), 23.3 (C-7), 22.9 (C-16); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 355.1 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₁₄H₂₄N₂O₅SNa 255.1298 [M+Na]⁺; gemessen: 255.1299 [M+Na]⁺; IR [cm⁻¹] ν_{max}: 3296, 2927, 1651, 1522, 1439, 1403, 1375, 1287, 1196, 1099, 970.



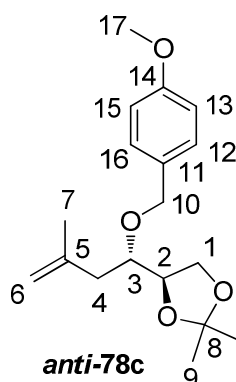
(R)-4-((S)-1-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylbut-3-en-1-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan
(*anti*-78c)/

(R)-4-((R)-1-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylbut-3-en-1-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (*syn*-78c)

Natriumhydrid (16.12 mmol, 650 mg) in DMF (10 mL) wurde bei 0 °C tropfenweise zu einer Lösung aus (R)-1-(2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-3-methylbut-3-en-1-ol (**77**) (13.43 mmol, 2.50 g) mit *para*-Methoxybenzylchlorid (13.43 mmol, 1.52 mL) in 20 mL THF gegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit Ammoniumchloridlösung (15 mL) gestoppt, die wässrige Phase mit Ethylacetat (3x20 mL) extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO₂, Cyclohexan/Ethylacetat, 20/1, R_{fanti} = 0.17, R_{fsyn} = 0.13)

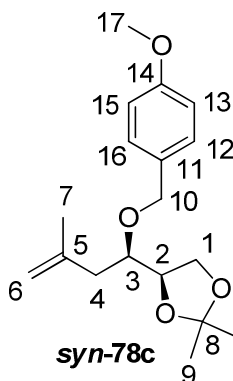
aufgereinigt und das gewünschte Produkt **78c** wurde mit einer Gesamtausbeute von 57% (7.61 mmol, 2.33 g, davon 1.20 g *anti*-Isomer) erhalten.

anti-Isomer: $^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 7.25 – 7.22 (m, 2H, H-13, H-15), 6.86 – 6.83 (m, 2H, H-12, H-16), 4.82 – 4.81 (m, 1H, H-6_a), 4.80 – 4.80 (m, 1H, H-6_b), 4.56 (s, 2H, H-10), 4.07 (ddd, $^3J = 6.5$ Hz, $^3J = 6.5$ Hz, $^3J = 5.2$ Hz, 1H, H-2), 4.00 (dd, $^2J = 8.0$ Hz, $^3J = 6.4$ Hz, 1H, H-1_a), 3.89 (dd, $^2J = 8.0$ Hz, $^3J = 6.7$ Hz, 1H, H-1_b), 3.78 (s, 3H, H-17), 3.69 (dd, $^3J = 6.4$ Hz, $^3J = 5.5$ Hz, 1H, H-3), 2.24 (d, $^3J = 6.3$ Hz, 2H, H-4), 1.75 (s, 3H, H-7), 1.42 (s, 3H, H-9), 1.34 (s, 3H, H-9'); $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 159.3 (C-14), 142.4 (C-5), 130.9 (C-11), 129.6 (C-13, C-15), 113.8 (C-12, C-16), 113.3 (C-6), 109.3 (C-8), 78.0 (C-3), 77.7 (C-2), 72.4 (C-10), 66.0 (C-1), 55.4 (C-17), 39.1 (C-4), 26.7 (C-9)*, 25.5 (C-9')*, 23.0 (C-7); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 329.2 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{Na}$ 329.1723 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 329.1716 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR [cm^{-1}] ν_{max} : 2934, 1513, 1246, 1211, 1068, 1031, 847, 821, 513.



syn-Isomer: $^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 7.28 – 7.25 (m, 2H, H-13, H-15), 6.88 – 6.85 (m, 2H, H-12, H-16), 4.85 – 4.81 (m, 1H, H-6_a), 4.81 – 4.77 (m, 1H, H-6_b), 4.64 (d, $^2J = 11.3$ Hz, 1H, H-10_a), 4.58 (d, $^2J = 11.3$ Hz, 1H, H-10_b), 4.20 (ddd, $^3J = 7.2$ Hz, $^3J = 6.6$ Hz, $^3J = 6.0$ Hz, 1H, H-2), 3.97 (dd, $^2J = 8.3$ Hz, $^3J = 6.6$ Hz, 1H, H-1_a), 3.80 (s, 3H, H-17), 3.72 (dd, $^2J = 8.3$ Hz, $^3J = 7.2$ Hz, 1H, H-1_b), 3.60 (ddd, $^3J = 8.0$ Hz, $^3J = 6.0$ Hz, $^3J = 4.4$ Hz, 1H, H-3), 2.23 (ddd, $^2J = 14.2$ Hz, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 0.8$ Hz, 1H, H-4_a), 2.17 (dd, $^2J = 14.2$ Hz, $^3J = 4.4$ Hz, 1H, H-4_b), 1.73 (d, $^4J = 0.9$ Hz, 3H, H-7), 1.44 (s, 3H, H-9), 1.36 (s, 3H, H-9'); $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 159.3 (C-14), 142.4 (C-5), 130.9 (C-11), 129.6 (C-13, C-15), 113.8 (C-12, C-16), 113.3 (C-6), 109.4 (C-8), 78.0 (C-3), 77.7 (C-2), 72.4 (C-10), 66.0 (C-1), 55.4 (C-17), 39.2 (C-4), 26.7

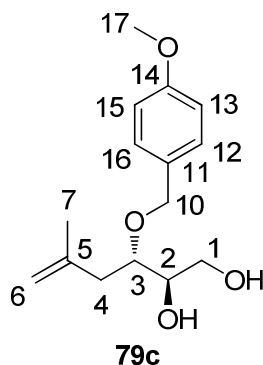
(C-9)*, 25.5 (C-9')*, 23.0 (C-7); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 329.2 (100) $[M+Na]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $C_{18}H_{26}O_4Na$ 329.1723 $[M+Na]^+$; gemessen: 329.1723 $[M+Na]^+$; IR $[cm^{-1}]$ ν_{max} : 3440, 2934, 1612, 1513, 1245, 1173, 820, 511.



(2R,3S)-3-(4-Methoxybenzyloxy)-5-methylhex-5-en-1,2-diol (79c)

(*R*)-4-((*S*)-1-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylbut-3-en-1-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (*anti*-**78c**) (1.20 g, 3.92 mmol) in Essigsäure/Wasser (30 mL, 4/1) wurde für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , Cyclohexan/Ethylacetat 1/1, R_f = 0.18) aufgereinigt, es wurden 1.06 g (3.37 mmol, 86%) Diol **79c** in Form einer farblosen Flüssigkeit erhalten.

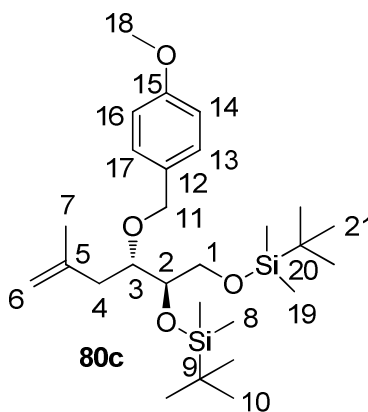
1H -NMR: (400 MHz, $CDCl_3$, RT) δ [ppm] = 7.25 – 7.23 (m, 2H, H-13, H-15), 6.89 – 6.84 (m, 2H, H-12, H-16), 4.85 (s, 1H, H-6_a), 4.82 (s, 1H, H-6_b), 4.59 (d, 2J = 11.0 Hz, 1H, H-10_a), 4.46 (d, 2J = 11.0 Hz, 1H, H-10_b), 3.79 (s, 3H, H-17), 3.81 – 3.66 (m, 4H, H-1, H-2, H-3), 2.62 (brs, 2H, -OH), 2.40 (dd, 2J = 14.2 Hz, 3J = 6.8 Hz, 1H, H-4_a), 2.24 (dd, 2J = 14.4 Hz, 3J = 5.9 Hz, 1H, H-4_b), 1.77 (s, 3H, H-7). ^{13}C -NMR: (100 MHz, $CDCl_3$, RT) δ [ppm] = 159.5 (C-14), 142.3 (C-5), 130.2 (C-11), 129.7 (C-13, C-15), 114.0 (C-12, C-16), 113.7 (C-6), 79.5 (C-3), 72.8 (C-2), 72.5 (C-10), 63.2 (C-1), 55.4 (C-17), 39.6 (C-4), 22.9 (C-7); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 289.1 (100) $[M + Na]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $C_{15}H_{22}O_4Na$ 289.1410; gemessen: 289.1410 $[M + Na]^+$; IR $[cm^{-1}]$ ν_{max} : 3346, 2940, 2835, 1606, 1513, 1248, 1022, 821, 512.



(R)-5-((S)-1-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylbut-3-en-1-yl)-2,2,3,3,8,8,9,9-octamethyl-4,7-dioxa-3,8-disiladecan (80c)

Zu (2*R*,3*S*)-3-(4-Methoxybenzyloxy)-5-methylhex-5-en-1,2-diol (**79c**) (3.37 mmol, 1.06 g) in DMF (30 mL) wurden *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (8.79 mmol, 1.32 g) und Imidazol (10.11 mmol, 0.69 g) gegeben und es wurde über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser versetzt, mit Diethylether extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO₂, Cyclohexan/Ethylacetat, 10/1, R_f = 0.5) aufgereinigt. Das TBS-geschützte Produkt **80c** wurde mit einer Ausbeute von 74% (2.49 mmol, 0.78 g) als farbloses Öl erhalten.

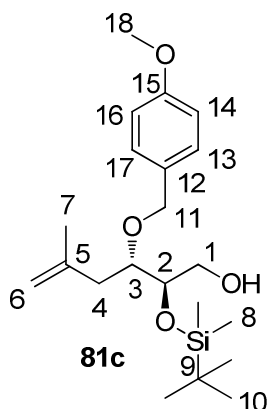
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.28 – 7.25 (m, 2H, H-13, H-17), 6.88 – 6.84 (m, 2H, H-14, H-16), 4.80 (s, 2H, H-6), 4.61 (d, ²J = 11.1 Hz, 1H, H-11_a), 4.45 (d, ²J = 11.1 Hz, 1H, H-11_b), 3.83 (m, 1H, H-2), 3.80 (s, 3H, H-18), 3.69 (td, ³J = 6.4 Hz, ³J = 3.0 Hz, 1H, H-3), 3.63 (d, ³J = 5.9 Hz, 2H, H-1), 2.26 (d, ³J = 6.4 Hz, 2H, H-4), 1.73 (s, 3H, H-7), 0.92 (s, 18H, H-10, H-10', H-10'', H-21, H-21', H-21''), 0.08 (s, 6H, H-8, H-8'), 0.07 (s, 6H, H-19, H-19'); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 159.1 (C-15), 143.6 (C-5), 131.3 (C-12), 129.5 (C-13, C-17), 113.7 (C-6), 112.6 (C-14, C-16), 78.8 (C-3), 75.3 (C-2), 72.2 (C-11), 64.7 (C-1), 55.4 (C-18), 39.3 (C-4), 26.1 (C-10, C-10', C-10'', C-21, C-21', C-21''), 23.0 (C-7), 18.5 (C-9)*, 18.3 (C-20)*, -4.3 (C-8)*, -4.5 (C-8')*, -5.2 (C-19)*, -5.3 (C-19')*; MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 517.3 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₂₇H₅₀O₄Si₂Na 517.3140 [M+Na]⁺; gemessen: 517.3145 [M+Na]⁺; IR [cm⁻¹] ν_{max}: 2953, 2928, 2856, 2359, 1513, 1471, 1247, 1084, 831, 774.



(2*R*,3*S*)-2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-3-(4-methoxybenzyloxy)-5-methylhex-5-en-1-ol (81c)

Zu (*R*)-5-((*S*)-1-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylbut-3-en-1-yl)-2,2,3,3,8,8,9,9-octamethyl-4,7-dioxa-3,8-disiladecan (**80c**) (2.49 mmol, 0.78 g) in THF (8 mL) wurden Pyridin (1.3 mL) und HF-Pyridin-Lösung (65-70% HF in Pyridin, 0.2 mL) gegeben und es wurde über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Diethylether (15 mL) versetzt und mit Salzsäure ($c = 0.5$ M, 10 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether (15 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger CuSO₄-Lösung (15 mL) und Wasser (15 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO₂, Cyclohexan/Ethylacetat, 5/1, $R_f = 0.24$) aufgereinigt. Der primäre Alkohol **81c** wurde mit 53% (1.32 mmol, 502 mg) Ausbeute als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.27 – 7.24 (m, 2H, H-13, H-17), 6.88 – 6.84 (m, 2H, H-14, H-16), 4.85 – 4.84 (m, 2H, H-6), 4.59 (d, ² J = 10.7 Hz, 1H, H-11_a), 4.54 (d, ² J = 10.7 Hz, 1H, H-11_b), 3.80 (s, 3H, H-18), 3.69 – 3.63 (m, 4H, H-1, H-2, H-3), 2.33 (dd, ² J = 14.0 Hz, ³ J = 3.0 Hz, 1H, H-4_a), 2.24 (dd, ² J = 14.0 Hz, ³ J = 7.9, 1H, H-4_b), 1.78 (t, ⁴ J = 0.9 Hz, 3H, H-7), 0.92 (s, 9H, H-10, H-10', H-10''), 0.10 (d, ³ J = 2.7 Hz, 6H, H-8, H-8'); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 159.4 (C-15), 143.0 (C-5), 130.7 (C-12), 129.7 (C-13, C-17), 113.9 (C-14, C-16), 113.3 (C-6), 79.6 (C-3), 74.8 (C-2), 73.2 (C-11), 64.1 (C-1), 55.4 (C-18), 41.0 (C-4), 26.0 (C-10, C-10', C-10''), 23.0 (C-7), 18.2 (C-9), -4.3 (C-8)*, -4.4 (C-8')*; MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 403.2 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): C₂₁H₃₆O₄SiNa 403.2275 [M+Na]⁺; gemessen: 403.2267 [M+Na]⁺; IR [cm⁻¹] ν_{\max} : 2957, 2928, 2856, 1513, 1256, 1082, 1011, 779, 670.



(2*S*,3*S*)-2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-3-(4-methoxybenzyloxy)-5-methylhex-5-enal
(**82c**)

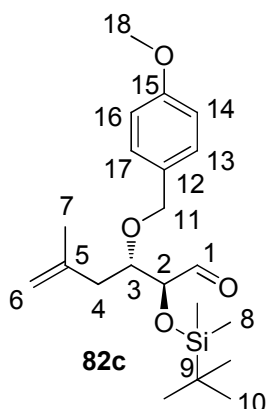
Zu einer Lösung aus Oxalylchlorid (1.98 mmol, 0.17 mL) in Dichlormethan (7 mL) wurde bei -78 °C Dimethylsulfoxid (4.35 mmol, 0.31 mL) gegeben und es wurde für 15 Minuten gerührt. 2-(*tert*-(2*R*,3*S*)-2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-3-(4-methoxybenzyloxy)-5-methylhex-5-en-1-ol (**81c**) (1.32 mmol, 502 mg) in Dichlormethan (7 mL) wurde langsam zugegeben und nach einer weiteren halben Stunde Triethylamin (6.73 mmol, 0.93 mL), wobei das Kältebad gegen ein Eisbad getauscht wurde. Es wurde für 20 Minuten gerührt, mit Dichlormethan (10 mL) und Wasser (10 mL) verdünnt, mit Dichlormethan (3x10 mL) extrahiert, getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Aldehyd **82c** wurde als gelbliche Flüssigkeit mit einer Ausbeute von 93% (1.23 mmol, 467 mg) erhalten. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Für einen kleinen Ansatz wurde die Dess-Martin-Periodinan-Methode verwendet:

Zu einer Lösung aus (2*R*,3*S*)-2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-3-(4-methoxybenzyloxy)-5-methylhex-5-en-1-ol (**81c**) (0.21 mmol, 80 mg) in Dichlormethan (2 mL) wurden nacheinander Natriumhydrogencarbonat (2.02 mmol, 170 mg) und Dess-Martin-Periodinan (1 mL, 3 M Lösung in Dichlormethan) gegeben und es wurde eine Stunde bei r.t. gerührt. Es wurde mit wässriger Natriumthiosulfatlösung gestoppt (2 mL, 1 M Lösung in Wasser), wässrige gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung zugegeben und mit Dichlormethan (3x5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

Der Aldehyd **82c** wurde mit einer Ausbeute von 95% (75 mg, 0.20 mmol) erhalten. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 9.59 (d, $^4J = 1.3$ Hz, 1H, H-1), 7.30 – 7.17 (m, 2H, H-13, H-17), 6.92 – 6.76 (m, 2H, H-14, H-16), 4.83 – 4.82 (m, 2H, H-6), 4.58 (d, $^2J = 11.3$ Hz, 1H, H-11_a), 4.49 (d, $^2J = 11.3$ Hz, 1H, H-11_b), 4.14 (dd, $^3J = 2.7$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, 1H, H-2), 3.83 (ddd, $^3J = 7.0$ Hz, $^3J = 7.0$ Hz, $^3J = 2.7$ Hz, 1H, H-3), 3.79 (s, 3H, H-18), 2.37 (dd, $^2J = 13.8$ Hz, $^3J = 7.0$ Hz, 1H, H-4_a), 2.27 (dd, $^2J = 13.8$ Hz, $^3J = 7.0$ Hz, 1H, H-4_b), 1.64 (s, 3H, H-7), 0.93 (s, 9H, H-10, H-10', H-10''), 0.08 (s, 3H, H-8)*, 0.07 (s, 3H-H-8'')*; $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 203.3 (C-1), 159.3 (C-15), 141.7 (C-5), 130.3 (C-13, C-17), 129.4 (C-12), 114.5 (C-14, C-16), 113.8 (C-6), 80.4 (C-3), 79.4 (C-2), 72.0 (C-11), 55.4 (C-18), 39.1 (C-4), 25.9 (C-10, C-10', C-10''), 22.7 (C-1), 18.3 (C-9), -4.7 (C-8)*, -4.8 (C-8'')*; MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 401.2 (20) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_4\text{SiNa}$ 401.2119 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 401.2115 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR [cm^{-1}] ν_{max} : 2958, 2929, 2856, 1514, 1257, 1080, 1012, 792, 684.

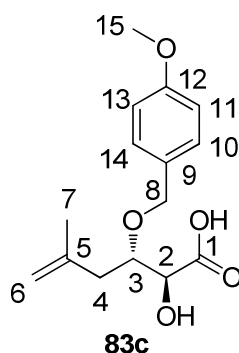


(2S,3S)-2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-3-(4-methoxybenzyloxy)-5-methylhex-5-ensäure (83c)

Zu einer Lösung aus (2S,3S)-2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-3-(4-methoxybenzyloxy)-5-methylhex-5-enal (**82c**) (1.23 mmol, 467 mg) in *tert*-Butanol/Wasser (28 mL, 3.5/1) wurden bei 0 °C Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (2.22 mmol, 307 mg), 2-Methyl-2-buten (22.4 mmol, 11.65 mL, 1.2 M Lösung in Tetrahydrofuran) und Natriumchlorit (3.02 mmol, 273 mg) gegeben. Es wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, aufkonzentriert, mit Wasser (10 mL) verdünnt und mit Salzsäure ($c = 1$ M) auf einen pH-Wert von 2 gebracht. Es wurde mit Diethylether (5x10 mL) extrahiert, die organische

Phase mit Natriumchloridlösung (10 mL) gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO₂; Cyclohexan/Aceton/Essigsäure 1/1/0.01, R_f = 0.01) aufgereinigt. Die Säure **83c** wurde als farbloses Öl mit einer Ausbeute von 67% (0.82 mmol, 230 mg) erhalten.

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 7.27 – 7.23 (m, 2H, H-10, H-14), 6.89 – 6.86 (m, 2H, H-11, H-13), 4.89 – 4.82 (m, 2H, H-6), 4.64 – 4.55 (m, 2H, H-8), 4.37 (dd, ³J = 3.5 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 1H, H-2), 3.94 (ddd, ³J = 7.7 Hz, ³J = 5.4 Hz, ³J = 3.5 Hz, 1H, H-3), 3.80 (s, 3H, H-15), 2.52 – 2.23 (m, 2H, H-4), 1.73 (d, ⁴J = 0.8 Hz, 3H, H-7); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 175.5 (C-1), 159.7 (C-12), 141.5 (C-5), 129.9 (C-10, C-14), 129.6 (C-15), 114.1 (C-11, C-13), 113.9 (C-6), 78.7 (C-3), 72.4 (C-2), 71.8 (C-8), 55.4 (C-15), 38.3 (C-4), 22.9 (C-1); MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)): 279.1 (100) [M-H]⁻; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₁₅H₁₉O₅ 279.1238 [M-H]⁻; gemessen: 279.1233 [M-H]⁻; IR [cm⁻¹] ν_{max}: 2938, 2362, 2341, 2156, 2003, 1729, 1514, 1360, 1034, 827.

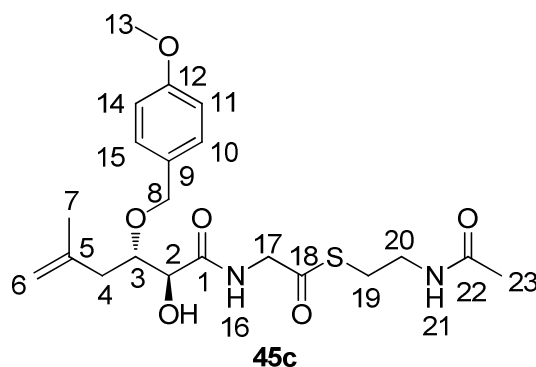


***S*-(2-Acetamidoethyl)-2-((2*S*,3*S*)-2-hydroxy-3-(4-methoxybenzyloxy)-5-methylhex-5-enamido)ethanthioat (45c)**

(2*S*,3*S*)-2-Hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-ensäure (**83c**) (0.82 mmol, 230 mg) wurde in DMF (8 mL) gegeben und für 15 min auf 0 °C gekühlt. *S*-(2-Acetamidoethyl)-2-aminoethanthioat-Hydrochlorid (0.98 mmol, 245 mg), 4-DMAP (2.06 mmol, 252 mg) und EDC·HCl (0.98 mmol, 193 mg) wurden langsam zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktion wurde am nächsten Tag mit gesättigter wässriger Ammoniumchloridlösung (3 mL) beendet, die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (3x10 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (10 mL) gewaschen. Es wurde über

Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, EtOAc, R_f = 0.22), erhalten wurden 73 mg einer farblosen Flüssigkeit des Intermediates **45c** (0.17 mmol, 21%).

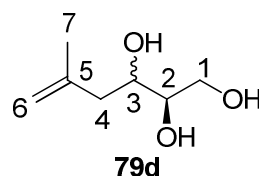
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 7.30 (s, 1H, H-21), 7.27 – 7.22 (m, 2H, H-10, H-15), 6.93 – 6.82 (m, 2H, H-11, H-14), 5.88 (s, 1H, H-16), 4.86 – 4.80 (m, 2H, H-6), 4.57 (d, ²J = 11.0 Hz, 1H, H-8_a), 4.52 (d, ²J = 11.0 Hz, 1H, H-8_b), 4.40 (d, ³J = 4.2 Hz, 1H, H-2), 4.21 (dd, ²J = 17.2 Hz, ³J = 6.1 Hz, 1H, H-17_a), 4.14 (dd, ²J = 17.2 Hz, ³J = 6.4 Hz, 1H, H-17_b), 4.01 – 3.97 (m, 1H, H-3), 3.80 (s, 3H, H-13), 3.43 (dt, ³J = 6.0 Hz, ³J = 6.2 Hz, 2H, H-20), 3.07 (t, ³J = 6.3 Hz, 2H, H-19), 2.37 (dd, ²J = 14.4 Hz, ³J = 9.0 Hz, 1H, H-4_a), 2.25 (dd, ²J = 14.4 Hz, ³J = 3.1 Hz, 1H, H-4_b), 1.96 (s, 3H, H-23), 1.74 (s, 3H, H-7); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 196.9 (C-18), 171.8 (C-22), 170.6 (C-1), 159.6 (C-12), 142.1 (C-5), 129.8 (C-9), 129.5 (C-10, C-15), 114.1 (C-11, C-14), 113.5 (C-6), 78.5 (C-3), 72.0 (C-2), 71.9 (C-8), 55.5 (C-13), 48.9 (C-17), 39.4 (C-20), 37.6 (C-4), 28.6 (C-19), 23.3 (C-7), 22.9 (C-23); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 461.2 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): C₂₁H₃₀N₂O₆SNa 461.1717 [M+Na]⁺; gemessen: 461.1718 [M+Na]⁺; IR [cm⁻¹] : IR [cm⁻¹] v_{max}: 3293, 2963, 1651, 1512, 1259, 1085, 799, 596..



(2R)-5-Methylhex-5-en-1,2,3-triol (79d)

4-(1-Hydroxy-3-methylbut-3-enyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (**77**) (3.00 g, 16.12 mmol) wurde in Essigsäure/Wasser (30 mL, 4/1) gelöst und für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO₂, Cyclohexan/Aceton, 5/1, R_f = 0.1) aufgereinigt. Das Triol **79d** wurde mit einer Ausbeute von 72% (12.12 mmol, 1.77 g) erhalten.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ = 4.92 (s, 1H, H-6), 4.84 (s, 1H, H-6'), 3.89 – 3.83 (m, 1H, H-3), 3.82 – 3.74 (m, 2H, H-1a, H-2), 3.63 (m, 1H, H-1b), 2.37 – 2.19 (m, 2H, H-4), 1.78 (d, 4J = 0.7 Hz, 3H, H-7); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) δ = 142.2 und 142.2 (C-5), 114.3 und 114.2 (C-6), 73.9 und 73.3 (C-3), 70.7 und 70.0 (C-2), 65.2 und 64.4 (C-1), 42.4 und 42.0 (C-4), 22.5 und 22.4 (C-7), MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 169.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_3\text{Na}$ 169.0835 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 169.0846 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR $[\text{cm}^{-1}]$ ν_{max} : 3376, 2935, 2361, 2340, 1653, 1373, 1220, 1084, 681.

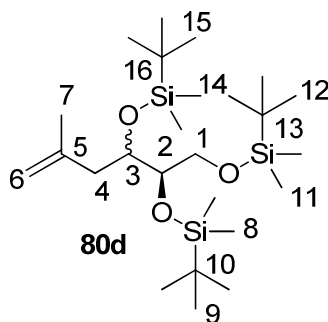


(2R)-1,2,3-Tri-(tert-butyltrimethylsilyloxy)-5-methylhex-5-en (80d)

Zu 3-Hydroxy-5-methylhex-5-en-1,2-diol (**79d**) (11.56 mmol, 1.68 g) in DMF (36 mL) gelöst wurden *tert*-Butyltrimethylsilylchlorid (45.08 mmol, 6.81 g) und Imidazol (52.02 mmol, 3.54 g) gegeben und es wurde über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser versetzt, mit Diethylether extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO_2 , Cyclohexan/Ethylacetat 60/1, R_f = 0.70) als mobile Phase gereinigt. Das dreifach geschützte Produkt **80d** wurde als farbloses Öl mit einer Ausbeute von 55% (6.34 mmol, 3.10 g) erhalten.

^1H -NMR: (400 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 4.78 – 4.72 (m, 4H, H-6), 3.97 – 3.82 (m, 2H, H-2), 3.74 – 3.71 und 3.64 – 3.59 (m, 4H, H-1), 3.50 – 3.45 (m, 2H, H-3), 2.41 und 2.26 (2 dd, 2J = 13.8 Hz, 2J = 13.4 Hz, 3J = 5.2 Hz, 3J = 1.7 Hz, 2H, H-4_a), 2.15 und 1.88 (2 dd, 2J = 13.8 Hz, 2J = 13.4 Hz, 3J = 9.3 Hz, 3J = 7.4 Hz, 2H, H-4_b), 1.74 und 1.71 (2 s, 6H, H-7), 0.91, (s, 18H, H-9, H-9', H-9'')*, 0.89 und 0.89 (2s, 18H, H-12, H-12', H-12'')*, 0.88 und 0.87 (2 s, 18H, H-15, H-15', H-15'')*, 0.09 und 0.08 (2 s, 12H, H-8, H-8''), 0.07 und 0.05 (2 s, 12H, H-11, H-11''), 0.03 (s, 12H, H-14, H-14''); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) δ = 143.3 und 143.0 (C-5), 113.3 und 113.0 (C-6), 76.7 und 74.7 (C-3), 73.0 und 72.6 (C-2), 65.2 und 64.7 (C-1), 41.6 und 39.9 (C-4), 26.16 und 26.22 (C-9, C-9', C-9''), 26.14 und 26.09 (C-12, C-12', C-12''), 26.05 und 26.03 (C-15, C-15', C-15''), 23.0 und 22.7 (C-7), 18.55 und 18.49 (C-10)*, 18.40 und 18.38 (C-13)*, 18.31

und 18.21 (C-16)*, -2.76 und -3.97 (C-8, C-8')*, -4.39 und -4.58 (C-11, C-11')*, -4.65 und -5.21 (C-14, C-14')*; MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 511.4 (100) $[M+Na]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $C_{25}H_{56}O_3Si_3Na$ 511.3429 $[M+Na]^+$; gemessen: 511.3430 $[M+Na]^+$; IR $[cm^{-1}]$ ν_{max} : 2954, 2929, 2857, 1472, 1361, 1252, 1097, 829, 810, 772, 667.

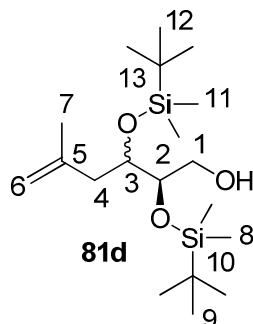


(2R)-2,3-Di-(tert-butyldimethylsilyloxy)-5-methylhex-5-en-1-ol (81d)

Zu **(2R)-1,2,3-Tri-(tert-butyldimethylsilyloxy)-5-methylhex-5-en (80d)** (6.34 mmol, 3.10 g) in THF (20 mL) wurden Pyridin (3.4 mL) und HF-Pyridin-Lösung (65-70% HF in Pyridin, 0.6 mL) gegeben und es wurde über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Diethylether versetzt und mit Salzsäure ($c = 0.5$ M, 20 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether (3x20 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter $CuSO_4$ -Lösung (20 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO_2 , Cyclohexan/EtOAc, 60/1, $R_f = 0.55$) aufgereinigt. Der Alkohol **81d** wurde als farbloses Öl mit 83% Ausbeute (5.26 mmol, 1.97 g) erhalten.

1H -NMR: (400 MHz, $CDCl_3$, RT) δ [ppm] = 4.86 – 4.71 (m, 4H, H-6), 3.94 – 3.56 (m, 8H, H-1, H-2, H-3), 2.29 (dd, $^2J = 14.0$ Hz, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, H-4_a), 2.19 (dd, $^2J = 14.0$ Hz, $^3J = 6.4$ Hz, 2H, H-4_b), 1.73 und 1.72 (2 s, 6H, H-7), 0.91 und 0.90 (2 s, 18H, H-9, H-9', H-9''), 0.88 und 0.87 (2 s, 18H, H-12, H-12', H-12''), 0.09 und 0.09 (2 s, 12H, H-8, H-8'), 0.06 und 0.06 (2s, 12H, H-11, H-11'); ^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 142.7 und 142.1 (C-5), 113.9 und 113.6 (C-6), 75.1 und 74.4 (C-2), 73.9 und 73.6 (C-3), 63.7 und 63.2 (C-1), 43.5 und 39.4 (C-4), 26.09 und 25.97 (C-9, C-9', C-9''), 26.05 und 25.88 (C-12, C-12', C-12''), 23.0 und 22.7 (C-7), 18.33 und 18.26 (C-10, C-13), -4.22 und -4.33 (C-8), -4.35 und -4.45 (C-8'), -4.40 und -4.53 (C-11), -4.45 und -4.57 (C-11');

MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 401.2 (100) $[M+Na]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $C_{19}H_{42}O_3Si_2Na$ 397.2565 $[M+Na]^+$; gemessen: 397.2568 $[M+Na]^+$; IR $[cm^{-1}]$ ν_{max} : 2954, 2929, 2857, 1472, 1252, 1091, 937, 889, 831, 773, 667.

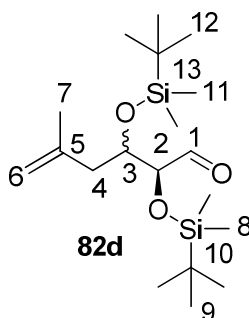


(2S)-2,3-Bis(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-5-methylhex-5-enal (81d)

Zu einer Lösung aus Oxalylchlorid (7.91 mmol, 0.69 mL) in Dichlormethan (25 mL) wurde bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ Dimethylsulfoxid (17.39 mmol, 1.23 mL) gegeben und es wurde für 15 Minuten gerührt. 2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-3-hydroxy-5-methylhex-5-en-1-ol (**81d**) (5.26 mmol, 1.97 g) in Dichlormethan (25 mL) wurde langsam zugegeben und nach einer weiteren halben Stunde Triethylamin (26.86 mmol, 3.72 mL), wobei das Kältebad gegen ein Eisbad getauscht wurde. Es wurde für 20 Minuten gerührt, mit Dichlormethan und Wasser verdünnt, mit Dichlormethan extrahiert, getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Aldehyd **82d** wurde als gelbliche Flüssigkeit mit einer Ausbeute von 97% (5.10 mmol, 1.90 g) erhalten und ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt.

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 9.78 und 9.52 (2 s, 2H, H-1), 4.82 – 4.80 (m, 4H, H-6), 4.02 – 3.96 (m, 4H, H-2, H-3), 2.48 – 2.43 (m, 2H, H-4_a), 2.13 – 2.08 (m, 2H, H-4_b), 1.72 – 1.66 (2 s, 6H, H-7), 0.93 und 0.93 (2 s, 18H, H-9, H-9', H-9''), 0.88 und 0.87 (2 s, 18H, H-12, H-12', H-12''), 0.09 – 0.07 (m, 24H, H-8, H-8', H-11, H-11'); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ = 203.8 und 203.6 (C-1), 142.0 und 141.3 (C-5), 115.1 und 113.9 (C-6), 81.2 und 79.7 (C-2), 75.3 und 73.4 (C-3), 42.1 und 41.2 (C-4), 25.97 und 25.88 (C-9, C-9', C-9'')* 25.94 und 25.85 (C-12, C-12', C-12'')*, 22.9 und 22.7 (C-7), 18.4 und 18.3 (C-10, C-13), -4.48 und -4.54 (C-8), -4.67 und -4.75 (C-11); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 395.3 (100) $[M+Na]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $C_{19}H_{40}O_3Si_2Na$

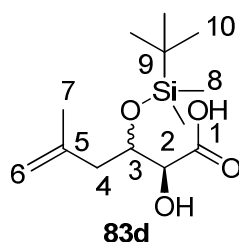
395.2408 [M+Na]⁺; gemessen: 395.2411 [M+Na]⁺; IR [cm⁻¹] ν_{max} : 2954, 2929, 2857, 2360, 1727, 1471, 1254, 1095, 809, 777, 670.



(2S)-2,3-Bis(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-5-methylhex-5-enolsäure (83d)

Zu einer Lösung aus (2S)-2,3-Bis(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-5-methylhex-5-enal (**82d**) (5.10 mmol, 1.90 g) in *tert*-Butanol/Wasser (116 mL, 3.5/1) wurden bei 0 °C Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (9.18 mmol, 1.27 g), 2-Methyl-2-buten (92.70 mmol, 48.20 mL, 2 M Lösung in Tetrahydrofuran) und Natriumchlorit (12.51 mmol, 1.13 g) gegeben. Es wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, aufkonzentriert, mit Wasser (50 mL) verdünnt und mit Salzsäure ($c = 1$ M) auf einen pH-Wert von 2 gebracht. Es wurde mit Diethylether (5x50 mL) extrahiert, die organische Phase mit Natriumchloridlösung (50 mL) gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO₂, Cyclohexan/Ethylacetat/ Essigsäure, 1/1/0.01, $R_f = 0.38$) aufgereinigt. Die Säure **83d** wurde als farbloses Öl mit einer Ausbeute von 53% (2.70 mmol, 740 mg) erhalten.

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃, RT) δ [ppm] = 4.93 – 4.78 (m, 4H, H-6), 4.29 (d, ³ $J = 2.6$ Hz, 2H, H-2), 4.19 – 4.15 (m, 2H, H-3), 2.49 – 2.44 und 2.19 – 2.14 (m, 2H, H-4_{a,b}), 2.37 (dd, ² $J = 13.8$ Hz, ³ $J = 6.6$ Hz, 1H, H-4_a), 2.28 (dd, ² $J = 13.8$ Hz, ³ $J = 6.4$ Hz, 1H, H-4_b), 1.77 (2 s, 6H, H-7), 0.88 (s, 18H, H-10, H-10', H-10''), 0.11 – 0.08 (m, 6H, H-8, H-8'); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 174.93 und 174.92 (C-1), 141.2 und 140.9 (C-5), 114.9 und 114.5 (C-6), 73.9 und 71.6 (C-2), 73.1 und 71.4 (C-3), 41.9 und 41.3 (C-4), 25.9 und (C-10, C-10', C-10''), 22.92 und 22.85 (C-7), 18.2 und 18.1 (C-9), -4.36 und -4.47 (C-8), -4.59 und -4.95 (C-8'); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)): 273.2 (100) [M-H]⁻; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): C₁₃H₂₅O₄Si 273.1528 [M-H]⁻; gemessen: 253.1520 [M-H]⁻; IR [cm⁻¹] ν_{max} : 2927, 2856, 2362, 2341, 1715, 1653, 1472, 1258, 1109, 836, 777, 669.

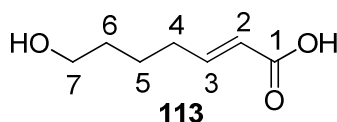


4.2.4 Synthese von (*E*)-*S*-(2-Acetamidoethyl)-7-hydroxyhept-2-enthioat (**46**) und *S*-(2-Acetamidoethyl)-2-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)ethanthioat (**47**)

(*E*)-7-Hydroxyhept-2-enolsäure (**113**)

Tetrahydro-2-hydroxypyran (**112**) (48.99 mmol, 5.00 g) wurde mit Malonsäure (53.82 mmol, 5.60 g), Pyridin (75.85 mmol, 6.00 g) und Piperidin (2.82 mmol, 0.24 g) versetzt und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Es wurde auf 100 °C unter Rückfluss erhitzt bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Die Lösemittel wurden unter vermindertem Druck entfernt, es wurde mit verdünnter wässriger Schwefelsäure ($c = 1$ M) versetzt und mit Diethylether (3x50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die Säure **113** wurde säulenchromatographisch (SiO₂, Cyclohexan/Ethylacetat, 9/1, v/v, $R_f = 0.2$) aufgereinigt und es wurden 44% (21.65 mmol, 3.12 g) Ausbeute als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.05$ (dt, $^3J = 15.6$ Hz, $^3J = 6.9$ Hz, 1H, H-3), 5.83 (dt, $^3J = 15.6$ Hz, $^3J = 1.5$ Hz, 1H, H-2), 3.66 (t, $^3J = 6.1$ Hz, 2H, H-7), 2.26 (tdd, $^3J = 6.9$ Hz, $^3J = 6.9$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, 2H, H-4), 1.63 – 1.52 (m, 4H, H-5, H-6).

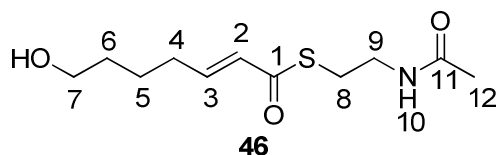


(*E*)-*S*-(2-Acetamidoethyl)-7-hydroxyhept-2-enthioat (**46**)

Zu einer Lösung aus (*E*)-7-Hydroxyhept-2-enolsäure (**113**) (4.17 mmol, 0.60 g) in Dichlormethan (35 mL) wurde bei 0 °C *N*-Acetylcysteamin (**57**) (5.87 mmol, 0.70 g), 4-DMAP (kat. Mengen) und EDC·HCl (4.17 mmol, 0.80 g) gegeben und das

Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktion wurde mit gesättigter wässriger Ammoniumchloridlösung (20 mL) gestoppt und die Phasen wurden separiert. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (3x30 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (30 mL) gewaschen. Es wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde erst säulenchromatographisch vorgereinigt (SiO₂, EtOAc, R_f = 0.4), dann per HPLC (Mmethanol/Wasser, 60/40 zu 100/0 über 20 Minuten, R_t = 6.89 min) von der geschlossenen Form getrennt. Erhalten wurden 73 mg des Thioesters **46** in Form einer farblosen Flüssigkeit (0.30 mmol, 7%).

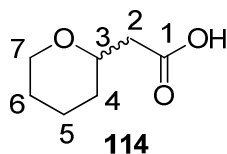
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 6.91 (dt, ³J = 15.5 Hz, ³J = 6.9 Hz, 1H, H-3), 6.12 (d, ³J = 15.5 Hz, 2H, H-2, H-10), 3.64 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, H-7), 3.46 – 3.40 (m, 2H, H-9), 3.07 (t, ³J = 6.4 Hz, 2H, H-8), 2.31 – 2.21 (m, 2H, H-4), 1.95 (s, 3H, H-12), 1.63 – 1.53 (m, 4H, H-5, H-6); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 190.6 (C-1), 170.7 (C-11), 146.3 (C-3), 128.6 (C-2), 62.4 (C-7), 39.9 (C-9), 32.1 (C-6), 32.0 (C-4), 28.3 (C-8), 24.3 (C-5), 23.3 (C-12); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)) 268.1 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): C₁₁H₁₉NO₃SNa 268.0978 [M+Na]⁺; gemessen: 268.0976 [M+Na]⁺; IR [cm⁻¹] ν_{max}: 3293, 2934, 2866, 1653, 1628, 1557, 1435, 1375, 1055, 975.



2-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)essigsäure (114)

Zu einer Lösung aus DMSO (30 mL), Piperidin (0.82 mmol, 0.07 g), Essigsäure (0.83 mmol, 0.05 g) und Malonsäure (80.72 mmol, 8.40 g) wurde Tetrahydro-2-hydroxypyran (**112**) (39.19 mmol, 4.00 g) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten bei r.t. gerührt, danach wurde für vier Stunden bei 100 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in Wasser gegeben und mit Diethylether (3x30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger Natriumchloridlösung (40 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt. Erhalten wurden 2.50 g der Säure **114** in Form eines farblosen Feststoffes (17.34 mmol, 44%). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 3.94 (m, 1H,

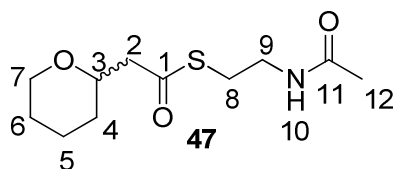
H-3), 3.75 – 3.64 (m, 1H, H-7_a), 3.53 – 3.39 (m, 1H, H-7_b), 2.50 (dd, $^2J = 15.4$ Hz, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, H-2_a), 2.38 (dd, $^2J = 15.4$ Hz, $^3J = 5.1$ Hz, 1H, H-2_b), 1.68 – 1.41 (m, 6H, H-4, H-5, H-6).



***S*-(2-Acetamidoethyl)-2-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)ethanthioat (47)**

Zu einer Lösung aus 2-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)essigsäure (**114**) (3.47 mmol, 0.50 g) in Dichlormethan (30 mL) wurde bei 0 °C *N*-Acetylcysteamin (**57**) (4.87 mmol, 0.58 g), 4-DMAP (kat. Mengen) und EDC*HCl (3.50 mmol, 0.67 g) langsam zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit wässriger gesättigter Ammoniumchloridlösung (20 mL) gestoppt, die Phasen wurden separiert, die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (3x30 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (40 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, EtOAc, *R_f* = 0.3), erhalten wurde der Thioester **47** in Form einer farblosen Flüssigkeit (2.37 mmol, 0.58 g, 68%).

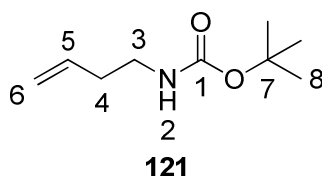
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 5.95 (s, 1H, H-10), 3.99 – 3.87 (m, 1H, H-3), 3.76 (dddd, $^2J = 10.5$ Hz, $^3J = 8.2$ Hz, $^3J = 4.6$ Hz, $^4J = 2.1$ Hz, 1H, H-7_a), 3.48 – 3.37 (m, 3H, H-7_b, H-9), 3.02 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 2H, H-8), 2.77 (dd, $^2J = 14.8$ Hz, $^3J = 8.3$ Hz, 1H, H-2_a), 2.59 (dd, $^2J = 14.8$ Hz, $^3J = 4.6$ Hz, 1H, H-2_b), 1.94 (s, 3H, H-12), 1.87 – 1.75 (m, 1H, H-4_a), 1.51 (m, 4H, H-5, H-6), 1.36 – 1.32 (m, 1H, H-4_b). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 197.8 (C-1), 170.4 (C-11), 74.7 (C-3), 68.7 (C-7), 50.9 (C-2), 39.7 (C-9), 31.6 (C-4), 28.7 (C-8), 25.7 (C-6), 23.33 (C-5)*, 23.27 (C-12)*; MS (ESI, 10 eV, *m/z* (%)) 268.1 (100) [M+Na]⁺; HR-MS (ESI, 10 eV, *m/z*): C₁₁H₁₉NO₃SNa 268.0978 [M+Na]⁺; gemessen: 268,0977 [M+Na]⁺; IR [cm⁻¹] *v*_{max}: 3294, 2935, 2858, 2362, 2342, 1686, 1651, 1556, 1441, 1375, 1089.



4.2.5 Versuchte Synthese von (E)-2-((2R,4S)-4-Amino-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)acetaldehydoxim (**53**)

tert-Butylbut-3-en-1-ylcarbamate (**121**)

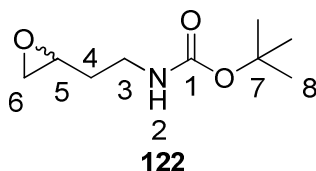
But-3-en-1-amin (**120**) (14.07 mmol, 1.00 g) wurde in Dichlormethan (20 mL) gelöst und mit Triethylamin (20.20 mmol, 2.80 mL) versetzt. Es wurde auf 0 °C gekühlt und Di-*tert*-butyldicarbonat (15.00 mmol, 3.27 g) wurde zugegeben. Es wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO₂, Cyclohexan/Aceton, 4/1, R_f = 0.51) aufgereinigt. Es wurden 58% (8.16 mmol, 1.40 g) des geschützten Amins **121** in Form einer farblosen Flüssigkeit erhalten. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.74 (ddt, ³J = 17.1 Hz, ³J = 10.2 Hz, ³J = 6.8 Hz, 1H, H-5), 5.16 – 5.01 (m, 2H, H-6), 4.48 (s, 1H, H-2), 3.18 (t, ³J = 6.8 Hz, 2H, H-3), 2.23 (ddt, ³J = 6.8 Hz, ³J = 6.8 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 2H, H-4), 1.43 (s, 9H, H-8).



tert-Butyl-(2-(oxiran-2-yl)-ethyl)carbamate (**122**)

tert-Butylbut-3-en-1-ylcarbamate (**121**) (8.16 mmol, 1.40 g) wurde in Dichlormethan (100 mL) gelöst und bei 0 °C wurde *meta*-Chlorperbenzoesäure (13.90 mmol, 2.40 g) zugegeben und es wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Es wurde mit gesättigter wässriger Kaliumcarbonatlösung gestoppt, mit Wasser (70 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet, es wurden 81% (6.61 mmol, 1.24 g) des Epoxids **122** in Form einer farblosen Flüssigkeit erhalten.

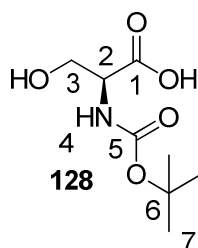
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 4.80 (s, 1H, H-2), 3.28 (dd, 2J = 12.1 Hz, 3J = 6.0 Hz, 2H, H-6), 2.99 – 2.95 (m, 1H, H-5), 2.81 – 2.72 (dd, 3J = 4.9 Hz, 3J = 4.3 Hz, 1H, H-3_a), 2.50 (dd, 3J = 4.9 Hz, 3J = 2.7 Hz, 1H, H-3_b), 1.97 – 1.83 (m, 1H, H-4_a), 1.63 – 1.57 (m, 1H, H-4_b), 1.42 (s, 9H, H-8).



(S)-2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-3-hydroxypropansäure (**128**)

L-Serin (**127**) (23.80 mmol, 2.50 g) wurde in *tert*-Butanol (60 mL) und Wasser (160 mL) gelöst und bei 0 °C wurden Natriumhydroxid (47.85 mmol, 1.90 g) und Di-*tert*-butyldicarbonat (23.80 mmol, 5.22 g) zugegeben und es wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Es wurde mit HCl (c = 1.4 M) angesäuert und die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3x70 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt **128** wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet, es wurden 69% (16.42 mmol, 3.37 g) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.45 (d, 3J = 5.6 Hz, 1H, H-4), 4.23 (m, 1H, H-2), 3.87 (d, 3J = 3.9 Hz, 2H, H-3), 1.47 (s, 9H, H-7).

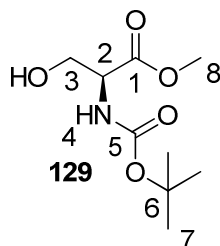


(S)-Methyl 2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-3-hydroxypropanoat (**129**)

Zu (S)-2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-3-hydroxypropansäure (**128**) (16.42 mmol, 3.37 g) in Dimethylformamid (20 mL) wurde Kaliumcarbonat (18.02 mmol, 2.49 g) gegeben. Es wurde auf 0 °C gekühlt und Methyljodid (32.83 mmol, 4.68 g) wurde langsam zugegeben. Es wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Es wurde mit Wasser versetzt und mit Ethylacetat (3x20 mL) extrahiert und die organische Phase mit Wasser (3x20 mL)

gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO₂, Dichlormethan/Methanol, 20/1, R_f = 0.01). Es wurden 68% (11.17 mmol, 2.45 g) des Methylesters **129** in Form einer gelblichen Flüssigkeit erhalten.

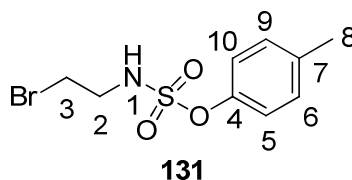
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.45 (s, 1H, H-4), 4.38 (m, 1H, H-2), 3.96 (dd, ²J = 11.2, ³J = 3.8 Hz, 1H, H-3_a), 3.90 (dd, ²J = 11.2 Hz, ³J = 3.3 Hz, 1H, H-3_b), 3.78 (s, 3H, H-8), 1.45 (s, 9H, H-7).



p-Tolyl-(2-bromoethyl)sulfamat (**131**)

2-Bromoethanaminiumbromid (**130**) (12.20 mmol, 2.50 g) wurde in Pyridin (20 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es wurde *para*-Toluolsulfonsäurechlorid (15.74 mmol, 3.00 g) zugegeben und es wurde für 2.5 h bei r.t. gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in Wasser (170 mL) mit Natriumchlorid gegossen und für eine weitere Stunde gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert und das Rohprodukt aus Chloroform/Cyclohexan umkristallisiert. Es wurden 76% (9.27 mmol, 2.72 g) tosylgeschütztes Bromid **131** in Form von farblosen Kristallen erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.85 – 7.66 (m, 2H, H-5, H-10), 7.33 (d, ³J = 7.9 Hz, 2H, H-6, H-9), 4.90 (s, 1H, H-1), 3.42 – 3.34 (m, 4H, H-2, H-3), 2.44 (s, 3H, H-8).

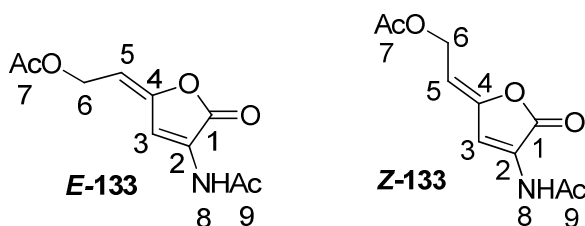


(*E*)-2-(4-Acetamido-5-oxofuran-2-yliden)ethylacetat (*E*-133)/

(*Z*)-2-(4-Acetamido-5-oxofuran-2-yliden)ethylacetat (*Z*-133)

Glucosaminsäure (**132**) (7.69 mmol, 1.50 g) wurde mit Acetanhydrid (12.50 mL) und Natriumacetat (18.29 mmol, 1.50 g) versetzt und auf etwa 650 °C erhitzt, bis eine leichte Gelbfärbung eintrat. Es wurde Wasser (10 mL) zugegeben und mit Dichlormethan (3x10 mL) extrahiert. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde aus Benzol umkristallisiert. Es wurden 40% (3.08 mmol, 0.69 mg) der Diastereomere ***E,Z*-133** in Form von weißen Kristallen erhalten.

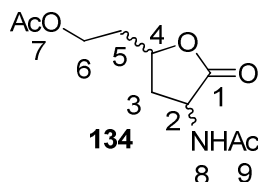
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.54 (s, 1H, H-8), 10.50 (s, 1H, H-8'), 7.83 (s, 1H, H-3), 7.58 (s, 1H, H-3'), 5.73 (t, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, H-5), 5.54 (t, ³*J* = 7.4 Hz, 1H, H-5'), 4.79 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 2H, H-6), 4.76 (d, ³*J* = 7.4 Hz, 2H, H-6'), 2.12 (s, 3H, H-9), 2.10 (s, 3H, H-9'), 2.03 (s, 3H, H-7), 2.02 (s, 3H, H-7').



2-(4-Acetamido-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)ethylacetat (134**)**

Zu einer Mischung aus (*E*)- und (*Z*)-2-(4-Acetamido-5-oxofuran-2-yliden)ethylacetat (***E,Z*-133**) (3.08 mmol, 0.69 g) in Ethylacetat (35 mL) wurde Palladium (10% auf Kohle, 0.30 g) gegeben. Es wurde unter einer Wasserstoffatmosphäre über Nacht bei r.t. gerührt, dann filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 0.70 g (100%, 3.06 mmol) der gesättigten Verbindung **134** in Form eines farblosen Öls erhalten.

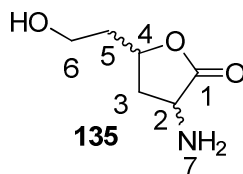
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6.50 (d, ³*J* = 6.2 Hz, 1H, H-8), 4.66 (ddd, ³*J* = 12.0 Hz, ³*J* = 8.5 Hz, ³*J* = 6.2 Hz, 1H, H-2), 4.56 (dtd, ³*J* = 10.8 Hz, ³*J* = 7.6 Hz, ³*J* = 5.4 Hz, 1H, H-4), 4.27 – 4.14 (m, 2H, H-6), 2.87 (ddd, ²*J* = 12.4 Hz, ³*J* = 8.5 Hz, ³*J* = 5.4 Hz, 1H, H-3_a), 2.04 (s, 3H, H-7), 2.03 (s, 3H, H-9), 2.08 – 2.01 (m, 2H, H-5), 1.88 – 1.79 (ddd, 1H, ²*J* = 12.4 Hz, ³*J* = 12.0 Hz, ³*J* = 10.8 Hz, H-3_b).



3-Amino-5-(2-hydroxyethyl)dihydrofuran-2-on (135)

2-(4-Acetamido-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)ethylacetat (**134**) (3.06 mmol, 0.70 g) wurde in HCl ($c = 6$ M, 50 mL) für 1.5 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösemittel wurde entfernt und das entstandene Produkt getrocknet. Es wurden 0.20 g (45%, 1.38 mmol) des entschützten Produktes **135** in Form eines weißen Feststoffes erhalten.

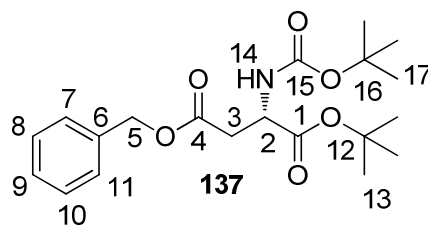
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) $\delta = 4.85$ (dtd, $^3J = 10.4$ Hz, $^3J = 7.7$ Hz, $^3J = 5.2$ Hz, 1H, H-4), 4.55 (dd, $^3J = 12.3$ Hz, $^3J = 8.8$ Hz, 1H, H-2), 3.79 (td, $^3J = 6.3$ Hz, $^4J = 1.0$ Hz, 2H, H-6), 2.95 (ddd, $^2J = 12.6$ Hz, $^3J = 8.8$ Hz, $^3J = 5.2$ Hz, 1H, H-3_a), 2.16 (td, $^2J = 12.6$, $^3J = 12.3$ Hz, $^3J = 10.4$ Hz, 1H, H-3_b), 2.08 – 2.06 (m, 2H, H-5).



N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*L*-*tert*-butyl-asparaginsäure-4-benzylester (137)

Zu *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*L*-asparaginsäure-4-benzylester (**136**) (30.95 mmol, 10.00 g) in Dichlormethan (20 mL) wurden *tert*-Butanol (36.80 mmol, 3.40 mL), DCC (36.00 mmol, 3.70 g) und 4-DMAP (3.00 mmol, 0.38 g) gegeben. Es wurde für zwei Stunden gerührt, filtriert und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , Cyclohexan/Ethylacetat 10/1, $R_f = 0.2$) aufgereinigt. Es wurden 79% (24.45 mmol, 9.10 g) des *tert*-Butylesters **137** in Form eines farblosen Öls erhalten.

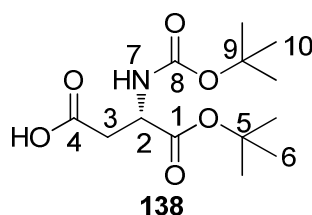
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 7.39 - 7.30$ (m, 5H, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11), 5.45 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 1H, H-14), 5.15 (d, $^2J = 12.3$ Hz, 1H, H-5_a), 5.10 (d, $^2J = 12.3$ Hz, 1H, H-5_b), 4.52 – 4.40 (m, 1H, H-2), 2.98 (dd, $^2J = 16.8$ Hz, $^3J = 4.5$ Hz, 1H, H-3_a), 2.82 (dd, $^2J = 16.8$ Hz, $^3J = 4.9$ Hz, 1H, H-3_b), 1.44 (s, 9H, H-13)*, 1.41 (s, 9H, H-17)*.



***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*L*-*tert*-butyl-asparaginsäure (138)**

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*L*-*tert*-butyl-asparaginsäure-4-benzylester (**137**) (24.45 mmol, 9.10 g) wurde in Ethanol (150 mL) gelöst und es wurde Palladium (10% auf Kohle, 2.00 g) zugegeben. Es wurde unter einer Wasserstoffatmosphäre über Nacht gerührt, filtriert und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 6.72 g (23.23 mmol, 95%) Säure **138** als farbloser Feststoff erhalten.

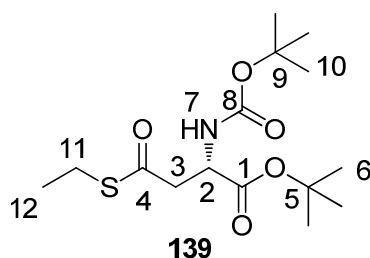
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.49 (d, 3J = 7.7 Hz, 1H, H-7), 4.49 – 4.39 (m, 1H, H-2), 2.98 (dd, 2J = 17.1 Hz, 3J = 3.5 Hz, 1H, H-3_a), 2.79 (dd, 2J = 17.1 Hz, 3J = 3.6 Hz, 1H, H-3_b), 1.44 (s, 18H, H-6, H-10).



(*S*)-*tert*-Butyl-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-4-(ethylthioester)-butanoat (139)

Zu *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*L*-*tert*-butyl-asparaginsäure (**138**) (6.92 mmol, 2.00 g) in Dichlormethan (20 mL) wurden bei 0 °C Dicyclohexylcarbodiimid (8.00 mmol, 1.65 g), 4-DMAP (kat. Mengen) und Ethanthiol (8.00 mmol, 497 mg) gegeben und über Nacht bei r.t. gerührt. Es wurde filtriert, aufkonzentriert und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO_2 , Cyclohexan/Ethylacetat, 5/1, R_f = 0.58) aufgereinigt. Es wurden 1.97 g (5.95 mmol, 86%) Thioester **139** als farbloses Öl erhalten.

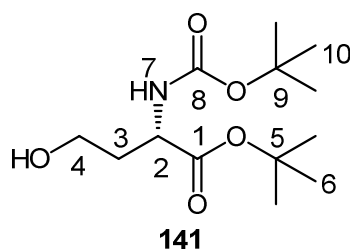
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.43 (d, 3J = 8.6 Hz, 1H, H-7), 4.44 – 4.40 (m, 1H, H-2), 3.20 – 3.14 (m, 1H, H-3_a), 3.01 (dd, 2J = 16.2 Hz, 3J = 4.6 Hz, 3H, H-3_b), 2.95 – 2.83 (m, 2H, H-11), 1.44 (s, 9H, H-6)*, 1.43 (s, 9H, H-10)*, 1.24 (t, 3J = 7.1 Hz, 3H, H-12).



(S)-tert-Butyl-2-(tert-butoxycarbonylamino)-4-hydroxybutanoat (141)

Zu *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*L*-*tert*-butyl-asparaginsäure (**138**) (23.23 mmol, 6.72 g) in Tetrahydrofuran (45 mL) wurden bei -10 °C Triethylamin (25.25 mmol, 3.50 mL) und Ethylchloroformiat (25.25 mmol, 2.74 g) tropfenweise gegeben und es wurde eine halbe Stunde bei -5 °C gerührt. Es wurde filtriert und das Filtrat wurde langsam bei 0 °C zu einer Lösung aus Natriumborhydrid (48.50 mmol, 1.83 g) in Wasser (18 mL) gegeben. Es wurde für weitere vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt, dann wurde mit Salzsäure (*c* = 1 M) auf einen pH-Wert von 2 angesäuert. Es wurde mit Ethylacetat (3x30 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (30 mL) und Natriumchloridlösung (30 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, Cyclohexan/Ethylacetat, 3/2, *R_f* = 0.38). Der Alkohol **141** wurde als farbloses Öl mit einer Ausbeute von 79% (18.35 mmol, 5.05 g) erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.34 (d, ³*J* = 7.3 Hz, 1H, H-7), 4.32 (t, ³*J* = 7.3 Hz, 1H, H-2), 3.66 – 3.58 (m, 2H, H-4), 3.43 (s, 1H, -OH), 2.10 (m, 2H, H-3), 1.44 (s, 9H, H-10)*, 1.42 (s, 9H, H-6)*.



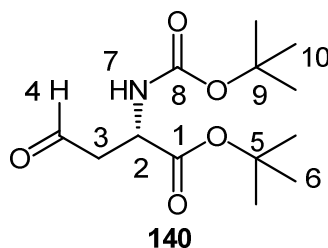
(S)-tert-Butyl-2-(tert-butoxycarbonylamino)-4-oxobutanoat (140) (Dess-Martin)

Zu (S)-4-tert-Butyl-2-(tert-butoxycarbonylamino)-4-hydroxybutanoat (**141**) (3.63 mmol, 1.00 g) in Dichlormethan (18 mL) wurden Natriumhydrogencarbonat (35.71 mmol, 3.00 g) und Dess-Martin-Periodinan (5.40 mmol, 17.90 mL einer 0.3 M Lösung in Dichlormethan) gegeben. Es wurde eine Stunde gerührt, dann wurde Natriumthiosulfatlösung ($c = 1.0$ M, 18 mL) zugegeben und es wurde für weitere fünf Minuten gerührt. Dann wurde gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung (18 mL) zugegeben und die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (3x15 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , Cyclohexan/Ethylacetat, 4/1, $R_f = 0.39$) und das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 80% (2.90 mmol, 0.79 g) erhalten.

Die Oxidation wurde ebenfalls erfolgreich mit der Swern-Oxidation durchgeführt:

Zu einer Lösung aus Oxalylchlorid (18.64 mmol, 1.62 mL) in Dichlormethan (60 mL) wurde bei -78°C DMSO (40.95 mmol, 2.91 mL) gegeben. Es wurde für 15 Minuten gerührt, dann wurde (S)-4-tert-Butyl-2-(tert-butoxycarbonylamino)-4-hydroxybutanoat (**141**) (12.43 mmol, 3.43 g) in Dichlormethan (60 mL) langsam zugegeben. Nach 30 Minuten wurde auf 0°C erwärmt und es wurde Triethylamin (63.27 mmol, 8.72 mL) zugegeben. Nach 20 Minuten wurde mit Dichlormethan (30 mL) und Wasser (50 mL) verdünnt und mit Dichlormethan (3x40 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , Cyclohexan/Ethylacetat, 4/1, $R_f = 0.39$). Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 85% (10.62 mmol, 2.93 g) erhalten.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 9.72$ (s, 1H, H-4), 5.35 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 1H, H-7), 4.48 – 4.42 (m, 1H, H-2), 3.00 (dd, $^2J = 17.8$ Hz, $^3J = 4.8$ Hz, 1H, H-3_a), 2.92 (dd, $^2J = 17.8$ Hz, $^3J = 5.0$ Hz, 2H, H-3_b), 1.44 (s, 9H, H-6)*, 1.43 (s, 9H, H-10)*.

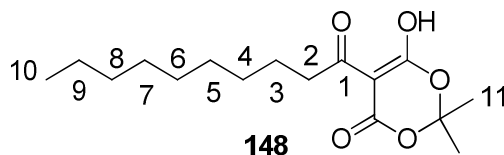


4.2.6 Synthese von *S*-(2-Acetamidoethyl)-3-oxododecanthioat (55)

5-Decanoyl-6-hydroxy-2,2-dimethyl-4*H*-1,3-dioxin-4-on (148)

Zu Decanoylsäure (**147**) (23.24 mmol, 4.00 g), DCC (51.13 mmol, 10.55 g) und 4-DMAP (51.13 mmol, 6.25 g) in Dichlormethan (90 mL) wurde 2,2-Dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (34.86 mmol, 5.02 g) in Dichlormethan (60 mL) zugegeben und es wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Es wurde mit Diethylether (60 mL) verdünnt und filtriert. Das Filtrat wurde drei Mal gewaschen (Essigsäure/Wasser, 1/10, 150 mL), die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Erhalten wurde das Intermediat **148** mit 94% Ausbeute (21.80 mmol, 6.50 g).

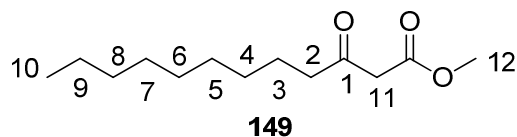
$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 3.08 – 3.00 (m, 2H, H-2), 1.70 (s, 6H, H-11, H-11'), 1.69 – 1.62 (m, 2H, H-3), 1.42 – 1.33 (m, 2H, H-4), 1.27 (m, 10H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9), 0.85 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 3H, H-10).



Methyl-3-oxododecanoat (149)

Das Intermediat **148** (21.80 mmol, 6.50 g) wurde in Methanol (20 mL) gelöst und für vier Stunden refluxiert. Das Methanol wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Methylester **149** wurde in 64% Ausbeute (13.95 mmol, 3.18 g) erhalten und direkt weiter umgesetzt.

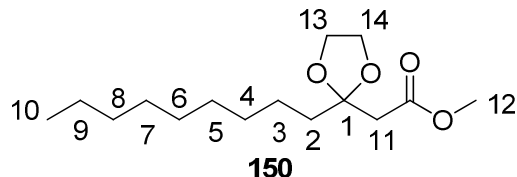
$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 3.71 (s, 3H, H-12), 3.42 (s, 2H, H-11), 2.50 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, H-2), 1.60 – 1.54 (m, 2H, H-3), 1.24 (m, 12H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9), 0.85 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 3H, H-10).



3,3-Diglycolacetal-dodecansäuremethylester (150)

Methyl-3-oxododecanoat (**149**) (13.16 mmol, 3.00 g) wurde mit Ethylenglykol (3.72 mol, 21.96 mL) in Dichlormethan (106 mL) gelöst und es wurde Trimethylchlorsilan (78.84 mmol, 9.96 mL) zugegeben. Es wurde vier Tage bei r.t. gerührt, sieben Mal mit Wasser (100 mL) gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO_2 , Hexan/Diethylether, 1/1, $R_f = 0.6$) aufgereinigt. Der geschützte Ester **150** wurde mit einer Ausbeute von 29% (3.78 mmol, 1.02 g) erhalten.

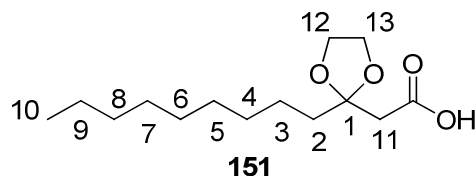
$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 3.97 (dd, $^2J = 4.2$ Hz, $^3J = 2.4$ Hz, 2H, H-13), 3.94 (dd, $^2J = 4.2$ Hz, $^3J = 2.5$ Hz, 2H, H-14), 3.67 (s, 3H, H-12), 2.64 (s, 2H, H-11), 1.83 – 1.73 (m, 2H, H-2), 1.40 – 1.32 (m, 2H, H-3), 1.27 (m, 12H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9), 0.86 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 3H, H-10).



3,3-Diglycolacetal-dodecansäure (151)

Methyl-2-(2-nonyl-1,3-dioxolan-2-yl)acetat (**150**) (3.78 mmol, 1.02 g) wurde in Natriumhydroxyd/ Ethanollösung ($c = 1$ M, 1/4, 260 mL) gelöst und für 16 Stunden refluxiert. Der pH-Wert wurde mit wässriger, gesättigter Ammoniumchloridlösung und anschließend mit Essigsäure auf 5 eingestellt und das Methanol wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die Lösung wurde mit Diethylether (200 mL) und Ethylacetat (200 mL) extrahiert und drei Mal mit Wasser (100 mL) gewaschen. Die organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Erhalten wurde die Säure **151** mit einer Ausbeute von 84% (3.18 mmol, 0.82 g).

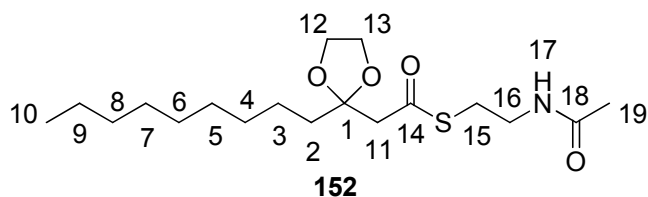
$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 4.03 – 4.00 (m, 2H, H-12), 4.00 – 3.97 (m, 2H, H-13), 2.69 (s, 2H, H-11), 1.81 – 1.77 (m, 2H, H-2), 1.43 – 1.34 (m, 2H, H-3), 1.32 – 1.23 (m, 12H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9), 0.87 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 3H, H-10).



***S*-(2-Acetamidoethyl)-3,3-diglycolacetaldecanthioat (152)**

Zu einer Lösung aus 2-(2-Nonyl-1,3-dioxolan-2-yl)essigsäure (**151**) (3.18 mmol, 0.82 g) in Dichlormethan (20 mL) wurde bei 0 °C *N*-Acetylcysteamin (**57**) (3.82 mmol, 0.46 g), 4-DMAP (kat. Mengen) und EDC*HCl (3.82 mmol, 0.73 g) langsam zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit wässriger gesättigter Ammoniumchloridlösung (10 mL) gestoppt, die Phasen wurden separiert, die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (3x20 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (20 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , EtOAc, $R_f = 0.22$), erhalten wurde der Thioester **152** in Form eines weißen Feststoffs (1.78 mmol, 0.68 g, 56%).

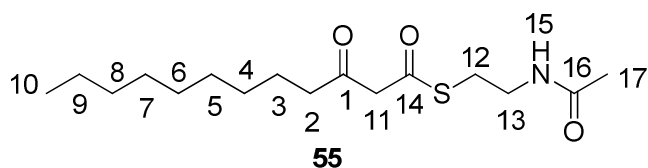
$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 5.83 (s, 1H, H-17), 4.00 (dd, $^3J = 3.5$ Hz, $^3J = 1.7$ Hz, 2H, H-12), 3.97 (dd, $^3J = 3.5$ Hz, $^3J = 1.7$ Hz, 2H, H-13), 3.47 – 3.40 (m, 2H, H-16), 3.04 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 2H, H-15), 2.90 (s, 2H, H-11), 1.95 (s, 3H, H-19), 1.77 – 1.72 (m, 2H, H-2), 1.37 (m, 2H, H-3), 1.24 (m, 12H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9), 0.87 (t, $^3J = 6.7$ Hz, 3H, H-10); $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 196.0 (C-14), 170.4 (C-18), 109.5 (C-1), 65.3 (C-12, C-13), 51.2 (C-11), 39.7 (C-16), 38.1 (C-2), 32.0 (C-8), 29.8 (C-15), 29.7 (C-4), 29.65 (C-7), 29.4 (C-6), 29.0 (C-5), 23.6 (C-3), 23.3 (C-9), 22.8 (C-19), 14.2 (C-10); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)) 382.2 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{NO}_4\text{SNa}$ 382.2023; gemessen: 382.2025 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR [cm^{-1}] ν_{max} : 3296, 2951, 2917, 2848, 1681, 1650, 1543, 1374, 1308, 1085, 986, 719, 601, 512.



***S*-(2-Acetamidoethyl)-3-oxododecanthioat (55)**

Zu einer Lösung aus *S*-(2-Acetamidoethyl)-2-(2-nonyl-1,3-dioxolan-2-yl)ethanthioat (**148**) (0.84 mmol, 0.30 g) in Wasser/Aceton (4/5, 125 mL) wurde HCl ($c = 1$ M, 28 mL) gegeben und es wurde zwei Tage gerührt. Das Aceton wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt aus Dichlormethan umkristallisiert. Erhalten wurden 45% (0.38 mmol, 0.12 g) des Thioesters **55** in Form eines weißen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 5.89 (s, 1H, H-15), 3.69 (s, 2H, H-11), 3.50 – 3.43 (m, 2H, H-13), 3.09 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 2H, H-12), 2.52 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, H-2), 1.98 (s, 3H, H-17), 1.61 – 1.53 (m, 2H, H-3), 1.26 (m, 12H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9), 0.88 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 3H, H-10); $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3 , RT) δ [ppm] = 201.5 (C-1), 191.6 (C-14), 169.6 (C-16), 56.3 (C-11), 42.6 (C-2), 38.4 (C-13), 31.0 (C-8), 28.5 (C-12), 28.48 (C-7), 28.40 (C-6), 28.38 (C-5), 28.1 (C-4), 22.6 (C-3), 22.3 (C-17), 21.8 (C-9), 13.2 (C-10); MS (ESI, 10 eV, m/z (%)) 338.2 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-MS (ESI, 10 eV, m/z): $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}_3\text{SNa}$ 338.1760; gemessen: 338.1758 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR $[\text{cm}^{-1}]$ ν_{max} : 3276, 2924, 2853, 2361, 2342, 1686, 1652, 1557, 1437, 1290, 1199, 1134, 1046, 952, 763, 627, 606.



4.3 Molekularbiologischer Teil

4.3.1 Medien und Puffer

LB-Medium für Bakterienkulturen

NaCl	10 g
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
ad 1 L <i>ddH</i> ₂ O	

Lysepuffer zur Proteinexpression

Tris	30.28 g
NaCl	29.22 g
ad 1 L <i>ddH</i> ₂ O, pH = 7.0	

LB-Agar für LB-Platten

LB-Medium	250 mL
Agar-Agar	3.75 g

Agarosegel für die Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer 1x	500 mL
Agarose	5 g
Ethidiumbromid	5 µL

TAE-Puffer (50x) für die Agarosegelelektrophorese

Tris	242 g
Essigsäure	57.1 mL
EDTA (0.5 M)	100 mL
ad 1000 mL <i>ddH</i> ₂ O	

Für die Gelelektrophorese wird der TAE-Puffer 50:1 mit Wasser verdünnt.

Puffer für die Minipräparation

Puffer P1 (autoklaviert)

Ethylendiamintetraessigsäure	0.74 g
<i>Tris</i> -HCl	1.21 g
<i>ddH</i> ₂ O	200 mL
pH 8.0 mit EDTA einstellen, 2 min kochen	
RNase A	20 mg

Puffer P2 (autoklaviert)

Natriumhydroxid	4.0 g
Natriumdodecylsulfat	5.0 g
<i>ddH</i> ₂ O	500 mL

Puffer P3 (autoklaviert)

Kaliumacetat	62.73 g
<i>ddH</i> ₂ O	200 mL
pH 5.5 mit Essigsäure einstellen	

SDS-Gele für die Proteinexpression

Trenngel (12%)

<i>ddH</i> ₂ O	4.9 mL
Tris-HCl (1.5 M, pH 8.8)	3.8 mL
Acrylamid 30%	6 mL
SDS 10%	0.15 mL
APS 10%	0.15 mL
TEMED	0.006 mL

Sammelgel (4.4%)

<i>ddH</i> ₂ O	2.7 mL
Tris-HCl (1.0 M, pH 6.8)	0.5 mL
Acrylamid 30%	0.67 mL
SDS 10%	0.04 mL
APS 10%	0.04 mL
TEMED	0.004 mL

Coomassielösung zum Anfärben der Proteingele

Coomassie	2.5 g
Methanol	300 mL
Eisessig	100 mL
ad 1 L ddH ₂ O	

4.3.2 Bakterienstämme

Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F- <i>ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIq ZAM15 Tn10</i> (TetR)]	Stratagene

4.3.3 Primer

Tabelle 4: Verwendete Primer, Schnittstellen sind unterstrichen abgebildet.

Primer	Sequenz
KS1 <i>EcoRI</i> for-2'	AAA AAA <u>GAA TTC</u> GAC CAA TCG GCC CGT GCT
KS1 <i>EcoRI</i> for-2	ATT TTA GAA TTC CCG TCG ACG AAG GGC AGA GAG
KS1 <i>NotI</i> rev	<u>TGC GGC CGC</u> TTA AGA TCG GGT GAG GAC
KS2 <i>BamHI</i> for	<u>GGA TCC</u> GAG CCA TCG CGG GTT
KS2 <i>HindIII</i> rev	<u>AAG CTT</u> TCA GTC GGT CGA CAG TGG T
KS3 <i>BamHI</i> for	<u>GGA TCC</u> CAG CTG CGG TGG ATT G
KS3 <i>HindIII</i> rev	<u>AAG CTT</u> TCA CAG ATC GAT GAG CTT ATT GG

4.3.4 Vektoren

Tabelle 5: Verwendete Vektoren

Name	Verwendung	Resistenz	Herkunft
pBluescript SK(+)	Lagerung und Restriktion von PCR-Fragmenten	Ampicillin	Fermentas
pHIS8 ¹⁰⁷	Expression <i>N</i> -terminaler His ₈ -Fusionsproteine	Kanamycin	Prof. Bradley Moore
pHIS8-svp ¹⁷⁵	Expression <i>N</i> -terminaler His ₈ -Fusionsproteine mit Co-Expression von svp	Kanamycin	Prof. Bradley Moore
pET-SUMO	Expression <i>N</i> -terminaler His ₆ -Fusionsproteine mit SUMO-Tag	Kanamycin	Invitrogen

4.3.5 Konstrukte

Tabelle 6: Dargestellte Konstrukte.

Konstrukt	Ausgangsvektor	Insert (aus dem Psymberin-Gencluster)
pSF3	pBluescript SK(+)	KS2
pSF4	pBluescript SK(+)	KS3
pSF5	pHis8	KS1.2
pSF6	pHis8	KS1.3
pSF7	pHis8	KS2
pSF8	pHis8	KS3.2
pSF9	pHis8	KS3.4
pSF10	pHis8	KS1
pSF11	pHis8	KS1'

4.3.6 Plasmidisolation durch alkalische Lyse

Die Plasmidisolation erfolgte durch die Minipräparation. 1.5 mL einer flüssigen Übernachtskultur wurden in einem 1.5 mL Reaktionsgefäß für 30 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 200 µL Puffer P1 suspendiert, danach wurden 200 µL des Puffers P2 zugegeben und es wurde invertiert. Nachdem 200 µL Puffer P3 zugegeben wurden und erneut invertiert wurde,

zentrifugierte man drei Minuten bei 13.000 rpm. Der Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß, in dem 500 µl Chloroform vorgelegt waren, gegeben, es wurde gemischt und bei 13.000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein weiteres Reaktionsgefäß, in dem sich 350 µL Isopropanol befanden, gegeben. Erneut wurde gemischt und die Ansätze wurden für 20 Minuten bei -20 °C aufbewahrt, danach wurde bei 4 °C für ebenfalls 20 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet zuerst mit 500 µL eisgekühltem 70%igem Ethanol gewaschen, dann für fünf Minuten bei 45 °C in der Speedvac getrocknet und zuletzt in 50 µL *ddH*₂O aufgenommen. Die DNA Probe wurde bei -20 °C aufbewahrt.

4.3.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion werden bestimmte Sequenzen eines DNA-Strangs vervielfältigt. Die PCR beinhaltet drei Schritte: Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation, die unterschiedliche Temperaturen benötigen. Während der Denaturierung werden die Wasserstoffbindungen zwischen den Strängen gespalten, so dass Einzelstränge erhalten werden. Bei der Primerhybridisierung lagern sich die beiden Primer spezifisch an die einzelsträngige DNA an, die Elongation dient zur Synthese des fehlenden Gegenstrangs durch eine DNA-Polymerase.

Die Annealingtemperatur hängt von den Schmelztemperaturen der eingesetzten Primer ab, welche sich nach folgender Gleichung berechnen lässt:

$$T_m = 69.3 + 0.41 \times [\text{GC}\%] - (650/\text{bp-Länge Primer})$$

Die Annealingtemperatur wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$T_{\text{anneal}} = T_m - 5 \text{ °C}$$

wobei die niedrigere Schmelztemperatur eines Primerpaares verwendet wird.

PCR-Ansätze wurden mit der Expand High Fidelity PLUS (*HiFi*-) DNA-Polymerase (Roche, Grenzach-Wyhlen) nach folgendem Schema angesetzt:

EXPERIMENTELLER TEIL

<i>HiFi</i> Polymerase (5 U/ μ L)	0.5 μ L
Polymerasepuffer mit Magnesiumsulfat (10 x)	10 μ L
dNTPs (10 mM)	1 μ L
DMSO (100%)	2.5 μ L
Primer1/2 (50 μ M)	je 0.5 μ L
DNA	1 μ L
ad 50 μ L mit <i>ddH</i> ₂ O	

Durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der *HiFi*-Polymerase wird das Risiko des Einbringens einer Mutation während der PCR erheblich gesenkt.

Tabelle 7: PCR-Reaktionsbedingungen.

Deckeltemperatur	99 °C	
Initialdenaturierung	96 °C	2 min
Denaturierung	96 °C	30 sek
Primerhybridisierung	$T_{anneal} = T_m - 5\text{ °C}$	1 min
Elongation	72 °C	1 min/kb
Schlussverlängerung	72 °C	10 min

Für KS1 wurden beim zweiten Ansatz die PCR-Bedingungen optimiert, es wurde zudem die *Phusion*[®]-High-Fidelity-Polymerase (NEB, Frankfurt/Main) verwendet. Für die PCR wurde eine zwei-Stufen-PCR durchgeführt. Hierbei werden die ersten Schritte zur Primerhybridisierung bei niedrigeren T_m ($T_{m, \text{klein}}$) durchgeführt, dadurch bindet zuerst ein kleinerer Primer-Überhang an das PCR-Produkt, später, bei der höheren T_m ($T_{m, \text{groß}}$) bindet dann der gesamte Primer. Folgende Zusammensetzung wurde verwendet:

<i>Phusion</i> Polymerase (2.5 U/ μ L)	0.5 μ L
Polymerasepuffer (5x)	1 μ L
dNTPs (10 μ M)	1 μ L
DMSO (100%)	2.5 μ L
Primer1/2 (10 μ M)	je 1 μ L
DNA	1 μ L
ad 50 μ L mit <i>ddH</i> ₂ O	

Tabelle 8: PCR-Bedingungen für die *Phusion*[®]-High-Fidelity-Polymerase.

Deckeltemperatur	99 °C	
Initialdenaturierung	98 °C	5 min
Denaturierung	98 °C	15 sek
Primerhybridisierung	$T_{\text{anneal}} = T_{\text{m,klein}} - 0.5 \text{ °C}$	20 sek
Elongation	72 °C	20 sek
Denaturierung	98 °C	15 sek
Primerhybridisierung	$T_{\text{anneal}} = T_{\text{m,groß}} - 0.5 \text{ °C}$	20 sek
Elongation	72 °C	20 sek
Schlussverlängerung	72 °C	7 min
Pause	10 °C	

D

2x

4.3.8 Kolonie PCR

Die Kolonie-PCR wird verwendet, um den Erfolg einer Transformation zu überprüfen. Die positiv getesteten Kolonien werden dann der Minipräparation unterzogen (siehe Abschnitt 4.3.6).

Kolonie-PCR-Ansätze wurden nach folgendem Schema angesetzt:

2.5 Einheiten <i>Taq</i> Polymerase (2.5 U/μL)	0.5 μL
Polymerasepuffer mit Magnesiumsulfat (10 x)	2.5 μL
dNTPs (10 mM)	0.5 μL
DMSO (100%)	2.5 μL
Primer1/2 (50 μM)	je 0.25 μL
DNA	Spuren
ad 25 μL mit <i>ddH</i> ₂ O	

Es wurde ein Mastermix hergestellt und anschließend auf 0.1 mL Reaktionsgefäße verteilt, für jede Reaktion wurde mit Hilfe eines Zahnstochers unter sterilen Bedingungen eine Kolonie von der Platte gepickt und im Reaktionsansatz resuspendiert. Zur Anfertigung einer Masterplatte wurde zunächst auf einer leeren Platte das entsprechende Antibiotikum ausgestrichen und anschließend die Kolonie aufgetragen.

4.3.9 Agarosegelelektrophorese

Um den Erfolg von PCRs oder Testverdauen zu überprüfen oder DNA aufzureinigen, wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet. Hierbei wird die unterschiedliche Größe von DNA-Fragmenten ausgenutzt, um eine Auftrennung mittels eines elektrischen Feldes zu erreichen. Es wurden 1%ige Agarosegele verwendet, als flüssige Phase diente 1xTAE Puffer. Um die DNA sichtbar zu machen, enthielt das Gel zusätzlich 0.005% Ethidiumbromid, das in der Lage ist, sich in die DNA einzulagern. Die zu untersuchende DNA wurde vor dem Beladen des Gels mit 6xBromphenolblau-Ladepuffer (0.25% Bromphenolblau, 30% Glycerin) versetzt. Die Gelelektrophorese lief bei 120 V für etwa 30 Minuten. Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht untersucht und gegebenenfalls aus dem Gel extrahiert. Für die Gelextraktion wurde neben jeder Probe ein kleines Aliquot dieser in eine separate Tasche gegeben, damit das spätere Ansehen der Proben unter UV-Licht möglich war. Das Gel wurde in Streifen geschnitten und die Größe und Lage des Produktes wurde über die herausgeschnittenen Aliquots bestimmt und danach ebenfalls aus dem Gel entfernt.

4.3.10 Gelextraktion mittels QIAgen Gel Extraction Kit

DNA wurde mit dem QIAgen Gel Extraction Kit aus dem Gel eluiert. Die gewünschte DNA wurde zunächst mit Hilfe eines scharfen Skalpells aus dem Agarosegel geschnitten und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Zu einer Volumeneinheit des Gels (wobei 100 mg ~ 100 µL entsprechen) wurden 3 Volumeneinheiten QC (Lösungs-) Puffers gegeben. Es wurde für 10 Minuten bei 50 °C inkubiert, dadurch löste sich das Gel in dem zugegebenen Puffer. Die verbleibende Lösung wurde schrittweise auf eine Qiaquick Säule gegeben und bei 13.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, auf die Säule wurden 500 µl QC-Puffer gegeben und es wurde erneut bei 13.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, es wurden 750 µL PE (Wasch-) Puffer zugegeben, unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert, der Überstand erneut verworfen und zum Entfernen des restlichen PE-Puffers wurde wieder für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Qiaquick Säule wurde in ein neues 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt, es wurden 35 µL ddH₂O auf die Mitte der Säule gegeben und es wurde für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Elution wurde

die Säule bei 13.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Die eluierte DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

4.3.11 Enzymatische Modifizierung von DNA

4.3.11.1 Ligation

Die Ligation wurde mit Hilfe einer T4 Ligase in einem 10 µL Ansatz durchgeführt. Das Verhältnis zwischen Insert und Vektor lag zwischen 1:1 und 3:1. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert, im Falle der KS1 und KS1' bei 16 °C.

T4 Ligasepuffer (10x)	1 µL
Insert DNA	6 µL
Vektor DNA	2 µL
T4 Ligase	1 µL

Nach der Ligation wurde das Enzym für zehn Minuten bei 65 °C inaktiviert.

4.3.11.2 Restriktion

Für die Restriktion wurden unterschiedliche Endonukleasen verwendet. Es wurden folgende Reagenzien zusammengegeben, vermischt und für drei Stunden bei 37 °C inkubiert:

	10 µL Ansatz	50 µL Ansatz
Verdauungsenzympuffer (10x)	1 µL	5 µL
BSA (10x)	1 µL	5 µL
DNA	3.5 µL	10 µL
Restriktionsenzym	0.5 µL	2.5 µL
	ad 10 µL ddH ₂ O	ad 50 µL ddH ₂ O

Doppelverdau

Hierbei wurde ebenfalls für drei Stunden inkubiert, die Zusammensetzung war folgende:

	10 µL Ansatz	50 µL Ansatz
Verdauungsenzympuffer (10x)	1 µL	5 µL
BSA (10x)	1 µL	5 µL
DNA	2 µL	10 µL
Restriktionsenzym 1	0.5 µL	2.5 µL
Restriktionsenzym 2	0.5 µL	2.5 µL
	ad 10 µL ddH ₂ O	ad 50 µL ddH ₂ O

4.3.11.3 Dephosphorylierung von pHis8

Die Dephosphorylierung wurde mit Hilfe der Antarctic Phosphatase in einem 40 µL Ansatz durchgeführt. Zuerst wurden 2 µL Phosphatase zugegeben und eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert, dann weitere 1.5 µL und es wurde für eine weitere halbe Stunde bei 37 °C inkubiert.

ddH ₂ O	15.5 µL
Puffer (10x)	4 µL
DNA	17 µL
Antarctic Phosphatase insgesamt	3.5 µL

Im Anschluss wurde das Enzym bei 65 °C für zehn Minuten inaktiviert.

4.3.12 Transfermethode für DNA: Elektroporation

4.3.12.1 Herstellung kompetenter Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden 5 mL LB-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht kultiviert. Die Übernachtskultur wurde in 200 mL LB-Medium gegeben und bei 37 °C bis zu einer optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0.4 bis 0.6 angezogen. Die folgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die 200 mL Kultur wurde in vier 50 mL Portionen aufgeteilt und diese bei 5.000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets in je 25 mL eisgekühltem 10%igem Glycerin resuspendiert und erneut bei 5.000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets wurden in je 10 mL eisgekühltem 10%igem

Glycerin resuspendiert und je zwei Portionen wurden vereinigt. Die nach dem erneuten Zentrifugieren erhaltenen Pellets wurden fünf Mal mit 10%igem Glycerin gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift erneut bei 5.000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert wurde. Anschließend wurden die verbleibenden Pellets in 5 mL Glycerin resuspendiert und zentrifugiert. Eines der nun erhaltenen Pellets wurde in 1 mL Glycerin gelöst und mit dem anderen Pellet vereinigt. Die nun erhaltene Suspension wurde auf 20 Eppendorfgefäße zu je 50 µL verteilt. Die kompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.3.12.2 Elektroporation

Die Elektroporation wurde mit Hilfe eines BIORAD MicropulsersTM ausgeführt, in dem die kompetenten Zellen mit 1.5 µL der ligierten DNA versetzt und in eine Küvette überführt wurden, in der der Elektroschock erfolgte. Die Küvette war zuvor schon für zehn Minuten mit UV-Licht bestrahlt worden um eine Sterilisation zu erzielen. Es handelte sich hierbei um eine spezielle Elektroporationsküvette mit 0.2 cm Dicke. Nach dem Elektroschock wurde 1 mL LB Medium hinzugegeben und die Zellen wurden für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. 300 µL der Zellsuspension wurden auf einer Agarplatte mit dem gewünschten Antibiotikum ausgestrichen. Die Parameter für die Elektroporation waren folgende:

Spannung	2500 V
Widerstand	200 Ω
Kondensatorkapazität	25 µF

4.3.13 SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE(engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) handelt es sich um eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, die zur Analyse von Proteinen verwendet wird. Hierbei wird ein Gel auf Polyacrylamidbasis sowie Natriumdodecylsulfat verwendet, das die Eigenladungen der Proteine überdeckt. Eine elektrische Spannung bewirkt schließlich durch eine Migration der gleichmäßig negativ geladenen Proteine eine Trennung dieser nach ihrer Größe.

Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und die Taschen wurden mittels eines hineingesteckten Kamms herausgebildet. Die Platten wurden nach der Auspolymerisation des Gels in die Gelelektrophoresekammer eingespannt, der SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0.1% SDS) wurde zugegeben und der Kamm entfernt. 20 - 30 μL der Proben wurden mit 20 - 30 μL SDS-Ladepuffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8; 200 mM DTT; 4% SDS; 0.2% Bromphenolblau; 20% Glycerin) vermischt und bei 78 °C für drei Minuten gekocht. Das Gel wurde beladen und es wurde eine Spannung von 80 - 100 V angelegt bis sich die Proteine am Ende des Sammelgels befanden, danach wurde die Spannung auf 120 V - 130 V erhöht.

Zum Sichtbarmachen der Proteine wurde der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Blue Brillant verwendet, dieser ist in der Lage sich an die basischen Seitenketten der Proteine anzulagern und färbt diese damit unspezifisch bläulich.

Die Gele wurden über Nacht in einer 10% (v/v) Essigsäurelösung entfärbt, die genaue Lage der Proteine wurde durch einen Proteinmarker (Thermo Scientific, Waltham) ermittelt.

4.3.14 Proteinexpression

4.3.14.1 Anzucht der Zellkultur

Es wurde das gewünschte Plasmid in *E. coli* BL21(DE3) mittels Elektroporation (siehe Abschnitt 4.3.12.2) eingebracht und anschließend auf einer Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und aus einer Kolonie wurde eine Übernachtskultur angesetzt. Am folgenden Tag wurde die Übernachtskultur in einen 250 mL Erlenmeyerkolben mit 100 mL LB-Medium und 100 μL des entsprechenden Antibiotikums überführt und es wurde bis zu einer OD_{600} von 0.7 – 1.0 inkubiert. Die Zelldichte wurde mit Hilfe eines Biophotometers (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) bestimmt. Als Referenzlösung verwendete man reines LB Medium, die Lösungen wurden in Einwegküvetten mit einer optischen Weglänge von einem Zentimeter gegeben. Eine OD_{600} von 0.1 entsprach einer Zelldichte von 1×10^8 Zellen/mL.

Danach wurde die Expression des Proteins mit 50 µL IPTG (0.5 M) induziert, das über eine Hemmung von LacI und die dadurch gebildete T7-Polymerase den T7-Promotor reguliert, und die Zellen wurden über Nacht bei 16 °C inkubiert.

4.3.14.2 Zellextraktvorbereitung

Am nächsten Tag wurden die Zellen in einem 50 mL Reaktionsgefäß für fünf Minuten bei 6.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Alle Schritte wurden von nun an auf Eis durchgeführt. Es wurde Lysepuffer pH 7.0 zugegeben, das Pellet wurde gelöst und die Mischung wurde fünf Mal für zehn Sekunden mit einem Leistungseintrag von 50 W und einer Frequenz von 40 Hz mit Ultraschall behandelt. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 11.000 rpm und 4 °C für 30 Minuten, wurde der Überstand vom Pellet getrennt. Ein Teil des Pellets wurde in Lysepuffer gelöst und für das SDS-Gel (siehe Abschnitt 4.2.13) wurden 20 µL Aliquots vom Pellet und vom Überstand genommen.

4.3.14.3 Aufreinigung der Proteine

Zu dem Überstand wurde anschließend Ni-NTA-Agarose (1 µL Ni-NTA/mL Kultur) gegeben und es wurde für eine Stunde auf Eis geschüttelt. Danach wurde alles in eine Polyprep®-Säule gefüllt, der Durchfluss wurde aufgefangen und die Säule wurde mit 5 mL Lysepuffer gewaschen. Das gewünschte Protein wurde mit 1 mL unterschiedlicher Konzentrationen Imidazol von der Säule gespült und aufgefangen, die verwendeten Elutionslösungen besaßen Konzentrationen von 50 mM bis 300 mM Imidazol in 50 mM Schritten.

Bei bekanntem Protein wurde mit 30 mM Imidazollösung gewaschen und das Protein mit 300 mM Imidazollösung von der Säule eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Bradfordtest oder mit einem IMPLEN NanophotometersTM P-330. Hierbei gilt das Lambert-Beersche Gesetz:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

mit: E = Extinktion, ϵ = Extinktionskoeffizient, c = Konzentration, d = Dicke der Küvette

Aus dem Gesetz folgt, dass die Extinktion sich linear proportional zur Konzentration der Lösung verändert, da die Parameter ϵ und d konstant bleiben.

Nach Aufreinigung der Proteine folgte die Umpufferung (siehe Abschnitt 4.3.14.4), die mit Hilfe von PD-10 Desalting Säulen (GE Healthcare) vorgenommen wurde. Hierbei wurde die imidazolhaltige Lösung gegen einen Puffer ausgetauscht, in dem das Protein gut haltbar war. Es folgte eine erneute Proteinkonzentrationsmessung mittels Bradfordtest oder des IMPLEN NanophotometersTM P-330. Bei zu geringer Konzentration des Proteins ($< 100 \mu\text{g/mL}$) wurde diese durch Vivaspin[®]-Säulen unterschiedlicher Membrandichte aufkonzentriert bis die gewünschte Konzentration erreicht war.

4.3.14.4 Stabilitätstest der Proteine

Um den besten Puffer für jedes Protein zu finden, wurde ein Stabilitätstest mit unterschiedlichen Puffern durchgeführt. Hierbei wurden die Proteine in großem Umfang exprimiert und über Ni-NTA-Säulchen aufgereinigt (siehe Abschnitt 4.3.14.3). Es wurde in verschiedenen Puffern (Tabelle 9) umpuffert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Tabelle 9: verwendete Puffer für die Puffertests.

Puffer	Molarität	pH-Wert
Kpi	0.1 M	7.0
Kpi	0.1 M	8.0
Tris/HCl, 10%Gly	0.1 M	7.5
Tris/HCl, 10%Gly	0.1 M	8.0
Tris/HCl, 10% Gly	0.1 M	8.5
MOPS	0.1 M	7.0
HEPES	0.05 M	7.5
HEPES	0.05 M	7.0

Es wurde 30 Minuten bei 11.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und es wurden $350 \mu\text{L}$ 72% TFA zugegeben und gut durchmischt. Dann wurde für 15 Minuten bei 4°C inkubiert, für weitere 30 Minuten bei 11.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgetrennt. Die denaturierten Proteine wurden mit $100 \mu\text{L}$ 1 M Tris-Puffer pH 8 wieder in Lösung gebracht und anschließend auf einem SDS-Gel (siehe Abschnitt 4.3.13) überprüft.

4.3.14.5 Abspaltung des SUMO-Tags

Für eine gute Produktion von PsyC war es notwendig, das Protein an einen SUMO1 (Small Ubiquitin-like Modifier)-Tag zu binden. Der SUMO-Tag verändert Proteinstruktur und Proteinfunktion, indem er kovalent an die Lysin-Seitenketten des Zielmoleküls bindet. SUMO-Modifikation von Proteinen kann viele Funktionen haben, am häufigsten wird der SUMO-Tag für eine höhere Stabilität, bessere Löslichkeit und Produktion eingesetzt.

Zur Abspaltung des SUMO1-Tags wird die SUMO-Protease 1 (Ulp1) verwendet. Diese ist eine Cystein-Protease, die die Sekundärstruktur von SUMO erkennt. Sie bringt den SUMO-Tag in seine Ursprungsform und dekonjugiert ihn auch von den Lysin-Seitenketten der Zielmoleküle.

Die SUMO-Protease 1 ist sehr widerstandsfähig und kann bei Temperaturen zwischen 4 °C und 37 °C und über einen breiten pH-Wert von 5.5 – 10.0 agieren.¹³²

Zur Abspaltung wurden die Elutionsfraktionen des Proteins in HEPES-Puffer pH 7.5 umgepuffert, um Salze und Imidazol zu entfernen. Der Verdau erfolgte in einem 500 µL Ansatz:

Elutionsfraktion	100 µL
SUMO-Proteasepuffer (10x)	50 µL
SUMO-Protease	10 µL
ad 500 µL ddH ₂ O	

Es folgte eine Inkubation bei 30 °C für eine Stunde, anschließend wurde erneut mit 100 µL Ni-NTA versetzt und für eine Stunde auf Eis geschüttelt. Der SUMO-Tag bindet hierbei durch den gebundenen His8-Tag an das Nickel. Die Aufreinigung erfolgte über Polyprep[®]-Säulen, das gewünschte Protein befand sich nun in der Durchflussfraktion. Es folgte erneut Umpufferung mit Hilfe von PD-10 Desalting Säulen (GE Healthcare), Konzentrationsmessung mittels Bradford oder des IMPLEN Nanophotometers[™] P-330 und gegebenenfalls Aufkonzentration mit Hilfe der Vivaspin[®]-Säulen.

4.3.15 Proteinassays

4.3.15.1 O-MT-Assay

Der *O*-Methyltransferase-Assay von PsyD wurde nach Vorschrift der Promotion von Dr. Katrin Zimmermann durchgeführt.⁸⁰ In einem 2 mL Reaktionsgefäß wurden folgende Mengen zusammengegeben:

300 µL Elutionsfraktion des Proteins

100 µL der 200 µM Testsubstratlösung **44a**

10 µL *S*-Adenosylmethionin (SAM (**96**))

Es wurde mit HEPES-Puffer, 0.05 M des pH-Wertes 7.5 auf 1 mL aufgefüllt (siehe Abschnitt 4.2.13.4). Die Endkonzentration des Proteins lag bei etwa 100 µg/mL. Als Negativkontrolle diente eine Probe mit denaturiertem Protein, die wie die Proben behandelt wurde. Der Reaktionsansatz wurde zusammengegeben, gevortext und eine Stunde bei 30 °C und 37 °C inkubiert. Danach wurden noch zwei Mal 10 µL SAM dazugegeben. Nach jeder Zugabe erfolgte eine Inkubation bei 30 °C/37 °C für eine weitere Stunde. Nach Ende der Inkubation wurde 1 mL Ethylacetat zugegeben um das organische Produkt von den übrigen Reagenzien zu separieren. Das Gemisch wurde kräftig geschüttelt und drei Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert um die Phasen zu trennen. Die organische Phase wurde in ein anderes Gefäß überführt und das Ethylacetat wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Inhalt des Gefäßes wurde zunächst massenanalytisch mittels Elektrosprayionisation (ESI) untersucht.

4.3.15.2 Assay von PsyC

Als Puffer wurde, ausgehend vom Stabilitätstest (siehe Abschnitt 4.2.13.4) 0.5 M HEPES-Puffer pH 7.5 eingesetzt. Alle Substanzen wurden zusammengegeben und die Suspension wurde für mindestens drei Stunden bei 30 °C inkubiert.

Die Zusammensetzung des Assays war folgende:

1 mM α -Ketoglutarat

0.1 mM Ascorbat

0.5 mM DTT

25 μ M Fe(II)sulfat

10 mM Substrat **96** in H₂O

150 μ l Proteinlösung, umgepuffert in 0.05 M HEPES-Puffer pH 7.5

ad 0.5 M HEPES-Puffer pH 7.5 bis 200 μ l

Es wurden drei verschiedene Proben angesetzt, die erste Probe war mit umgepuffelter Proteinlösung, die dritte war die Negativkontrolle. Bei der zweiten Probe wurde versucht, den an das Protein angehängten SUMO-Tag zu entfernen (siehe Abschnitt 4.3.14.5).

Ein zweiter Versuch mit einer erhöhten Menge an Ascorbat wurde nach folgendem Schema angesetzt:

300 μ M α -Ketoglutarat

4 mM Ascorbat

50 μ M Fe(II)sulfat

400 μ M Substrat **45b** in H₂O

8 μ M Protein, umgepuffert in 0.05 M HEPES-Puffer pH 7.5

ad 200 μ l 0.5 M HEPES-Puffer pH 7.5

Hier wurden vier verschiedene Proben angesetzt, die erste Probe war mit umgepuffelter Proteinlösung, bei der zweiten Probe wurde versucht, den an das Protein angehängten SUMOI-Tag zu entfernen (siehe Abschnitt 4.3.14.5). Bei der dritten sowie vierten Probe handelte es sich um die Negativkontrollen der beiden ersten Proben, in denen das Protein bei 98 °C für zehn Minuten denaturiert worden war. Die Detektion der Assays erfolgte erneut über LC/MS.

4.3.15.3 Assay von *PsyK*

Der Assay von *PsyK* wurde in Tris-Puffer pH 7.5 vorgenommen, die benötigten Reagenzien waren:

80 μ M Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH (**110**))

50 μ M Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD (**111**))

10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), pH 7.5

2 μ g Testsubstrat **44a,b**

1 μ g Protein

ad 10 mM Tris pH 7.5 zu 100 μ L

Die Reagenzien wurden zusammengegeben und die Oxidation von NADPH (**110**) wurde direkt mittels eines IMPLEN NanophotometersTM P-330 bei einer Wellenlänge von 340 nm in Abhängigkeit von der Zeit gemessen.

4.3.15.4 Acylierung von PsyD-ACP1

Das PsyD-ACP1 wurde in 25 mM Tris-Puffer pH 7.4 mit 500 mM NaCl umgepuffert. Die Acylierung des Proteins erfolgte über eine Inkubation des Substrats **44a** für eine Stunde mit der umgepufferten *holo*-PsyD-ACP1 Lösung bei 30°C.

Die Zusammensetzung war folgende:

10 mM Substrat **44a**

200 μ M *holo*-PsyD-ACP1

Anschließend wurde der Assay durchgeführt. Das ACP wurde durch Zugabe von Hydrazin gespalten und das Produkt wurde mittels Ethylacetat aus der wässrigen Phase extrahiert und über LC/MS vermessen.

4.4 Geräteliste

Agarosegelelektrophorese-Kammer + Spannungsquelle	
Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Analysenwaage CP225D	Sartorius, Göttingen
Autoklav V65	Systec, Wettenberg
Cellophan-Folien + Geltrocknungsrahmen	Roth, Karlsruhe
DC-Alufolie Kieselgel 60 F254	Merck, Darmstadt
Drehschiebervakuumpumpe RZ6	Vacuubrand, Wertheim
Elektroporationsküvette 2mm	Bio-Rad, München
Elektroporator MicroPulser	Bio-Rad, München
Geldokumentation Genius	Syngene, Cambridge
Halb-Mikroküvette (1.6 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Inkubationsschüttler Certomat BS-1	Sartorius, Göttingen
Inkubator B12	Thermo, Langenselbold
Kieselgel 60 (0.040- 0.063 mm)	Merck, Darmstadt
Membranvakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Mikroküvette UltraVette (70-850 µl)	Roth, Karlsruhe
Mikrowelle	Lifetec Medion, Essen
Mikrozentrifuge ungekühlt Mikro200	Hettich, Tuttlingen
Mikrozentrifuge, gekühlt 5417R	Eppendorf, Hamburg
Mikrozentrifuge, gekühlt Mikro200R	Hettich, Tuttlingen
Multigel (Gelelektrophoresesystem vertikal)	Biometra, Göttingen
Fotometer (Biophotometer)	Eppendorf, Hamburg
Fotometer BioMate 3	Thermo El., Cambridge
Pipetten Pipetman P2 - P10 mL	Gilson, Middleton (USA)
Poly-Prep Säule (leer)	Bio-Rad, München
Probenfläschchen für Autosampler	
(HPLC-Gefäße mit Deckel und Septum)	Roth, Karlsruhe
ProteanII xi cell (Gelelektrophoresesystem vertikal)	Bio-Rad, München
Rotationsverdampfer VV2000	Heidolph, Kelheim
Schüttler Rotamax 120	Heidolph, Kelheim
Speedvac / Konzentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank Biowizard	Kojair, Vilppula (FIN)
Sterilfilter (0.2 µm, Zelluloseacetat, FP 30/0,2)	Whatman , Dassel
Thermozykler T-Gradient	Biometra, Göttingen

Thermomixer komfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Rotina 35R	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge Z513K	Hermle, Wehingen
Ultraschallhomogenisator Sonopuls HD2070	Bandelin, Berlin
UV-Vernetzer CL1000 UVP	Cambridge (UK)
Vortex-Mixer VTX-3000L	LMS, Tokio (J)
Waage 440-47N	Kern, Balingen-Fromm.
Waage BP110	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifugaleinheiten Vivaspin 500 (versch. MWCO)	Sartorius, Göttingen

5. Literatur

1. Weissman, K. J. & Leadlay, P. F. Combinatorial Biosynthesis of Reduced Polyketides. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 925–936 (2005).
2. Fernandes, P. B. *et al.* In Vitro and in Vivo Evaluation of A-56268 (TE-031), a New Macrolide. *Antimicrob. Agents Chemoth.* **30**, 865–873 (1986).
3. Weissman, K. Polyketide Biosynthesis: Understanding and Exploiting Modularity. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **362**, 2671–2690 (2004).
4. McDaniel, R., Ebert-Khosla, S., Hopwood, D. A. & Khosla, C. Engineered Biosynthesis of Novel Polyketides. *Science* **262**, 1546–1550 (1993).
5. Hochmuth, T. & Piel, J. Polyketide Synthases of Bacterial Symbionts in Sponges – Evolution-Based Applications in Natural Products Research. *Phytochem.* **70**, 1841–1849 (2009).
6. Staunton, J. & Weissman, K. J. Polyketide Biosynthesis: a Millennium Review. *Nat. Prod. Rep.* **18**, 380–416 (2001).
7. Sattely, E. S., Fischbach, M. A. & Walsh, C. T. Total Biosynthesis: In Vitro Reconstitution of Polyketide and Nonribosomal Peptide Pathways. *Nat. Prod. Rep.* **25**, 757–793 (2008).
8. Heath, R. J. & Rock, C. O. The Claisen Condensation in Biology. *Nat. Prod. Rep.* **19**, 581–596 (2002).
9. Weissman, K. J. Introduction to Polyketide Biosynthesis. *Meth. Enzym.* **459**, 3–16 (2009).
10. Pfeifer, B. A. & Khosla, C. Biosynthesis of Polyketides in Heterologous Hosts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 106–118 (2001).
11. Mortison, J. D., Kittendorf, J. D. & Sherman, D. H. Synthesis and Biochemical Analysis of Complex Chain-Elongation Intermediates for Interrogation of Molecular Specificity in the Erythromycin and Pikromycin Polyketide Synthases. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 15784–15793 (2009).
12. Rawlings, B. J. Type I Polyketide Biosynthesis in Bacteria (Part A-Erythromycin Biosynthesis). *Nat. Prod. Rep.* **18**, 190–227 (2001).
13. Khosla, C., Tang, Y., Chen, A. Y., Schnarr, N. A. & Cane, D. E. Structure and Mechanism of the 6-Deoxyerythronolide B Synthase. *Annual Rev. Biochem.* **76**, 195–221 (2007).
14. Hertweck, C. The Biosynthetic Logic of Polyketide Diversity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 4688–4716 (2009).
15. Hendrickson, L. *et al.* Lovastatin Biosynthesis in *Aspergillus terreus*: Characterization of Blocked Mutants, Enzyme Activities and a Multifunctional Polyketide Synthase Gene. *Chem. Biol.* **6**, 429–439 (1999).

16. Campbell, C. D. & Vederas, J. C. Biosynthesis of Lovastatin and Related Metabolites Formed by Fungal Iterative PKS Enzymes. *Biopolymers* **93**, 755–763 (2010).
17. Brachmann, A. O. *et al.* A Type II Polyketide Synthase is Responsible for Anthraquinone Biosynthesis in *Photorhabdus luminescens*. *ChemBioChem* **8**, 1721–1728 (2007).
18. Sandmann, A. *et al.* A Type II Polyketide Synthase from the Gram-Negative Bacterium *Stigmatella aurantiaca* is Involved in Aurachin Alkaloid Biosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 2712–2716 (2007).
19. Hertweck, C., Luzhetskyy, A., Rebets, Y. & Bechthold, A. Type II Polyketide Synthases: Gaining a Deeper Insight Into Enzymatic Teamwork. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 162–190 (2007).
20. Moore, B. S. & Hopke, J. N. Discovery of a New Bacterial Polyketide Biosynthetic Pathway. *ChemBioChem* **2**, 35–38 (2001).
21. Austin, M. B. & Noel, J. P. Discovery of a New Bacterial Polyketide Biosynthetic Pathway. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 79–110 (2003).
22. Song, L. *et al.* Type III Polyketide Synthase β -Ketoacyl-ACP Starter Unit and Ethylmalonyl-CoA Extender Unit Selectivity Discovered by *Streptomyces coelicolor* Genome Mining. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 14754–14755 (2006).
23. Staunton, J. *et al.* Evidence for a Double-Helical Structure for Modular Polyketide Synthases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **3**, 188–192 (1996).
24. Gokhale, R. S., Tsuji, S. Y., Cane, D. E. & Khosla, C. Dissecting and Exploiting Intermodular Communication in Polyketide Synthases. *Sci.* **284**, 482–485 (1999).
25. Broadhurst, R. W., Nietlispach, D., Wheatcroft, M. P., Leadlay, P. F. & Weissman, K. J. The Structure of Docking Domains in Modular Polyketide Synthases. *Chem. Biol.* **10**, 723–731 (2003).
26. Cheng, Y.-Q., Tang, G.-L. & Shen, B. Type I Polyketide Synthase Requiring a Discrete Acyltransferase for Polyketide Biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 3149–3154 (2003).
27. Bumpus, S. B., Magarvey, N. A., Kelleher, N. L., Walsh, C. T. & Calderone, C. T. Polyunsaturated Fatty-Acid-Like Trans-Enoyl Reductases Utilized in Polyketide Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 11614–11616 (2008).
28. Cheng, Y., Coughlin, J. M., Lim, S. & Shen, B. Type I Polyketide Synthases That Require Discrete Acyltransferases. *Meth. Enzym.* **459**, 165–186 (2009).
29. Piel, J. Biosynthesis of Polyketides by *trans*-AT Polyketide Synthases. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 996–1047 (2010).
30. Piel, J., Hui, D., Fusetani, N. & Matsunaga, S. Targeting Modular Polyketide Synthases With Iteratively Acting Acyltransferases from Metagenomes of Uncultured Bacterial Consortia. *Environ. Microbiol.* **6**, 921–927 (2004).
31. Scotti, C. *et al.* A *Bacillus subtilis* Large Coding for a Polypeptide Highly Similar to Polyketide Synthases. *Gene* **130**, 65–71 (1993).

32. Piel, J. A Polyketide Synthase-Peptide Synthetase Gene Cluster from an Uncultured Bacterial Symbiont of *Paederus* Beetles. *PNAS* **99**, 14002–14007 (2002).
33. McQuillen, K., Roberts, R. B. & Britten, R. J. Synthesis of Nascent Protein by Ribosomes in *Escheria coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **45**, 1437–1447 (1959).
34. Felnagle, E. A. *et al.* Nonribosomal Peptide Synthetases Involved in the Production of Medically Relevant Natural Products. *Mol. Pharm.* **5**, 191–211 (2008).
35. Walsh, C. T., O'Brien, R. V & Khosla, C. Nonproteinogenic Amino Acid Building Blocks for Nonribosomal Peptide and Hybrid Polyketide Scaffolds. *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* **52**, 7098–7124 (2013).
36. Hur, G. H., Vickery, C. R. & Burkart, M. D. Explorations of Catalytic Domains in Non-Ribosomal Peptide Synthetase Enzymology. *Nat. Prod. Rep.* **29**, 1074–1098 (2012).
37. Weber, T., Baumgartner, R., Renner, C., Marahiel, M. A. & Holak, T. A. Solution Structure of PCP, a Prototype for the Peptidyl Carrier Domains of Modular Peptide Synthetases. *Structure* **8**, 407–418 (2000).
38. Samel, S. A., Schoenafinger, G., Knappe, T. A., Marahiel, M. A. & Essen, L.-O. Structural and Functional Insights into a Peptide Bond-Forming Bidomain from a Nonribosomal Peptide Synthetase. *Structure* **15**, 781–792 (2007).
39. Belshaw, P. J., Walsh, C. T. & Stachelhaus, T. Aminoacyl-CoAs as Probes of Condensation Domain Selectivity in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Science* **284**, 486–489 (1999).
40. Ehmman, D. E., Trauger, J. W., Stachelhaus, T. & Walsh, C. T. Aminoacyl-SNACs as Small-Molecule Substrates for the Condensation Domains of Nonribosomal Peptide Synthetases. *Chem. Biol.* **7**, 765–772 (2000).
41. Schwarzer, D., Finking, R. & Marahiel, M. A. Nonribosomal Peptides: From Genes to Products. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 275–287 (2003).
42. Walsh, C. T. *et al.* Tailoring Enzymes that Modify Nonribosomal Peptides During and After Chain Elongation on NRPS Assembly Lines. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 525–534 (2001).
43. Haese, A., Schubert, M., Herrmann, M. & Zocher, R. Molecular Characterization of the Enniatin Synthetase Gene Encoding a Multifunctional Enzyme Catalysing *N*-Methyldepsipeptide Formation in *Fusarium scirpi*. *J. Biol. Chem.* **7**, 905–914 (1993).
44. Stachelhaus, T. & Marahiel, M. A. Modular Structure of Peptide Synthetases Revealed by Dissection of the Multifunctional Enzyme GrsA. *J. Biol. Chem.* **270**, 6163–6169 (1995).
45. Stachelhaus, T. & Walsh, C. T. Mutational Analysis of the Epimerization Domain in the Initiation Module PheATE of Gramicidin S Synthetase. *Biochemistry* **39**, 5775–5787 (2000).
46. Gehring, A. M., Mori, I., Perry, R. D. & Walsh, C. T. The Nonribosomal Peptide Synthetase HMWP2 Forms a Thiazoline Ring during Biogenesis of Yersiniabactin, an Iron-Chelating Virulence Factor of *Yersinia pestis*. *Biochemistry* **37**, 11637–11650 (1998).

47. Miller, D. A. & Walsh, C. T. Yersiniabactin Synthetase: Probing the Recognition of Carrier Protein Domains by the Catalytic Heterocyclization Domains, Cy1 and Cy2, in the Chain-Initiating HMWP2 Subunit†. *Biochemistry* **40**, 5313–5321 (2001).
48. Cane, D. E. & Walsh, C. T. The Parallel and Convergent Universes of Polyketide Synthases and Nonribosomal Peptide Synthetases. *Chem. Biol.* **6**, R319 – R325 (1999).
49. Schwecke, T. *et al.* The Biosynthetic Gene Cluster for the Polyketide Immunosuppressant Rapamycin. *PNAS* **92**, 7839–7843 (1995).
50. Cichewicz, R. H., Valeriote, F. A. & Crews, P. Psymberin, A Potent Sponge-Derived Cytotoxin from Psammocinia Distantly Related to the Pederin Family. *Org. Lett.* **6**, 1951–1954 (2004).
51. Chen, X.-H. *et al.* Structural and Functional Characterization of Three Polyketide Synthase Gene Clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *J. Bacteriol.* **188**, 4024–4036 (2006).
52. Du, L., Sánchez, C., Chen, M., Edwards, D. J. & Shen, B. The Biosynthetic Gene Cluster for the Antitumor Drug Bleomycin from *Streptomyces verticillus* {ATCC15003} Supporting Functional Interactions Between Nonribosomal Peptide Synthetases and a Polyketide Synthase. *Chem. Biol.* **7**, 623–642 (2000).
53. Pettit, G. R. *et al.* Isolation and Structure of Irciniastatins A and B from the Indo-Pacific Marine Sponge *Ircinia ramosa*. *J. Med. Chem.* **47**, 1149–1152 (2004).
54. <http://www.mer-littoral.org/02/galerie-poriferes.php>.
55. Robinson, S. J. *et al.* Probing the Bioactive Constituents from Chemotypes of the Sponge *Psammocinia aff. bulbosa*. *J. Nat. Prod.* **70**, 1002–1009 (2007).
56. Jiang, X., García-Fortanet, J. & De Brabander, J. K. Synthesis and Complete Stereochemical Assignment of Psymberin/Irciniastatin A. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 11254–11255 (2005).
57. Huang, X., Shao, N., Palani, A., Aslanian, R. & Buevich, A. The Total Synthesis of Psymberin. *Org. Lett.* **9**, 2597–2600 (2007).
58. Smith, A. B., Jurica, J. A. & Walsh, S. P. Total Synthesis of (+)-Psymberin (Irciniastatin A): Catalytic Reagent Control as the Strategic Cornerstone. *Org. Lett.* **10**, 5625–5628 (2008).
59. Crimmins, M. T., Stevens, J. M. & Schaaf, G. M. Total Synthesis of Irciniastatin A (Psymberin). *Org. Lett.* **11**, 3990–3993 (2009).
60. Watanabe, T. *et al.* Syntheses and Biological Evaluation of Irciniastatin A and the C1–C2 Alkyne Analogue. *Org. Lett.* **12**, 1040–1043 (2010).
61. Wan, S. *et al.* Total Synthesis and Biological Evaluation of Pederin, Psymberin, and Highly Potent Analogs. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 16668–16679 (2011).
62. Byeon, S. R., Park, H., Kim, H. & Hong, J. Stereoselective Synthesis of 2,6-trans-Tetrahydropyran via Primary Diamine-Catalyzed Oxa-Conjugate Addition Reaction of α,β -Unsaturated Ketone: Total Synthesis of Psymberin. *Org. Lett.* **13**, 5816–5819 (2011).

63. Bielitz, Max, Pietruszka, J. An Enantioselective Mukaiyama Aldol Reaction as the Key Step towards the Tetrahydropyran Core of Psymberin via a γ -Butyrolactone Intermediate. *Synlett* **23**, 1625 (2012).
64. Kiren, S. & Williams, L. J. Configuration of the Psymberin Amide Side Chain. *Org. Lett.* **7**, 2905–2908 (2005).
65. Jiang, X., Williams, N. & De Brabander, J. K. Synthesis of Psymberin Analogues: Probing a Functional Correlation with the Pederin/Mycalamide Family of Natural Products. *Org. Lett.* **9**, 227–230 (2006).
66. Huang, X. *et al.* The Discovery of Potent Antitumor Agent C11-Deoxypsymbierin/Irciniastatin A: Total Synthesis and Biology of Advanced Psymbierin Analogs. *Org. Lett.* **11**, 867–870 (2009).
67. Fisch, K. *et al.* Polyketide Assembly Lines of Uncultivated Sponge Symbionts from Structure-Based Gene Targeting. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 494–501 (2009).
68. Hentschel, U. *et al.* Molecular Evidence for a Uniform Microbial Community in Sponges from Different Oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4431–4440 (2002).
69. Vacelet, J. & Donadey, C. Electron Microscope Study of the Association Between Some Sponges and Bacteria. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **30**, 301–314 (1977).
70. Gu, L. *et al.* GNAT-Like Strategy for Polyketide Chain Initiation. *Science* **318**, 970–974 (2007).
71. Silakowski, B. *et al.* New Lessons for Combinatorial Biosynthesis from Myxobacteria: The Myxothiazol Biosynthetic Gene Cluster of *Stigmatella aurantiaca*. *J. Biol. Chem.* **274**, 37391–37399 (1999).
72. Niederkrüger, H. Expressionssysteme zur Untersuchung der Pederin und Psymbierin Biosynthese aus nicht kultivierten bakteriellen Symbionten. *Dissertation*, Universität Bonn (2010).
73. Hausinger, R. P. Fe(II)/ α -Ketoglutarate-Dependent Hydroxylases and Related Enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biomol* **39**, 3129–3137 (2004).
74. Müller, I. *et al.* A Unique Mechanism for Methyl Ester Formation via an Amide Intermediate Found in Myxobacteria. *ChemBioChem* **7**, 1197–1205 (2006).
75. Kampa, A. *et al.* Metagenomic Natural Product Discovery in Lichen Provides Evidence for a Family of Biosynthetic Pathways in Diverse Symbioses. *PNAS* **110**, 3129–3137 (2013).
76. Kellner, Rupert L. L. , Dettner, K. Allocation of Pederin during Lifetime of Paederus Rove Beetles (*Coleoptera staphylinidae*): Evidence for Polymorphism of Hemolymph Toxin. *J. Chem. Ecol.* **21**, 1719–1733 (1995).
77. Kellner, R. L. & Dettner, K. Differential efficacy of toxic pederin in deterring potential arthropod predators of Paederus (Coleoptera: Staphylinidae) offspring. *Oecol. Plant.* **107**, 293–300 (1996).

78. Brega, A., Falaschi, A., De Carli, L. & Pavan, M. Studies on the Mechanism of Action of Pederin. *J. Cell Biol.* **36**, 485–496 (1968).
79. Kellner, R. L. L. Molecular Identification of an Endosymbiotic Bacterium Associated with Pederin Biosynthesis in *Paederus Sabaeus* (Coleoptera Staphylinidae). *Ins. Biochem. Mol. Biol.* **32**, 389–395 (2002).
80. Zimmermann, K. Expression und Untersuchung von Enzymen der Pederin Biosynthese aus einem nicht kultivierten Symbionten. *Dissertation*, Universität Bonn (2008).
81. Zimmermann, K., Engeser, M., Blunt, J. W., Munro, M. H. G. & Piel, J. Pederin-Type Pathways of Uncultivated Bacterial Symbionts: Analysis of *O*-Methyltransferases and Generation of a Biosynthetic Hybrid. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 2780–2781 (2009).
82. Omura, S., Mamda, H., Wang, N.-J., Imamura, N., Oiwa, R., Iwai, Y. Takaokamycin, a New Peptide Antibiotic Produced by *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* **37**, 700–705 (1984).
83. Andres, N. *et al.* Hormaomycin, ein neues Peptid-lacton mit morphogener Aktivität auf Streptomyceten. *Helv. Chim. Acta.* **72**, 426–437 (1989).
84. Rössner, E., Zeeck, A. & König, W. A. Elucidation of the Structure of Hormaomycin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **29**, 64–65 (1990).
85. Zlatopolskiy, B. D. *et al.* Final Elucidation of the Absolute Configuration of the Signal Metabolite Hormaomycin. *Chemistry* **10**, 4708–4717 (2004).
86. Otoguro, K., Ui, H., Ishiyama, A., Arai, N., Kobayashi, M., Takahashi, Y., Masuma, R., Shiomi, K., Yamada, H., Omura, S. In Vitro Antimalarial Activities of the Microbial Metabolites. *J. Antibiot.* **53**, 322–324 (2003).
87. Höfer, I. *et al.* Insights into the Biosynthesis of Hormaomycin, An Exceptionally Complex Bacterial Signaling Metabolite. *Chem. Biol.* **18**, 381–391 (2011).
88. Crüsemann, M. Studien zur Biosynthese des Hormaomycins. *Dissertation*, Universität Bonn (2012).
89. Irschik, H., Jansen, R., Höfle, G., Gerth, K. & Reichenbach, H. The Corallopyronins, new inhibitors of Bacterial RNA synthesis from Myxobacteria. *J. Antibiot.* **35**, 145–152 (1985).
90. Jansen, R., Höfle, G., Irschik, H. & Reichenbach, H. Antibiotika aus Gleitenden Bakterien, XXIV. Corallopyronin A, B und C – drei neue Antibiotika aus *Coralloccoccus coralloides* Cc c127 (Myxobacterales). *Liebigs Ann. der Chemie* **1985**, 822–836 (1985).
91. Irschik, H., Gerth, K., Höfle, G., Kohl, W. & Reichenbach, H. The Myxopyronins, New Inhibitors of Bacterial RNA Synthesis From *Myxococcus fulvus*. *J. Antibiot.* **36**, 1651–1658 (1983).
92. Erol, Ö. *et al.* Biosynthesis of the Myxobacterial Antibiotic Corallopyronin A. *ChemBioChem* **11**, 1253–1265 (2010).
93. Geders, T. W. *et al.* Crystal Structure of the ECH2 Catalytic Domain of CurF from *Lyngbya majuscula*: Insights into a Decarboxylase Involved in Polyketide Chain β -Branching. *J. Biol. Chem.* **282**, 35954–35963 (2007).

94. Butcher, R. *et al.* The Identification of Bacillaene, the Product of the PksX Megacomplex in *Bacillus subtilis*. *PNAS*. **104**, 1506–1509 (2007).
95. Kunst, F. *et al.* The Complete Genome Sequence of the Gram-Positive Bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249–256 (1997).
96. Dorrestein, P. C. *et al.* Activity Screening of Carrier Domains within Nonribosomal Peptide Synthetases Using Complex Substrate Mixtures and Large Molecule Mass Spectrometry. *Biochem.* **45**, 1537–1546 (2006).
97. Moldenhauer, J., Chen, X.-H., Borriss, R. & Piel, J. Biosynthesis of the antibiotic bacillaene, the product of a giant polyketide synthase complex of the *trans*-AT family. *Angew. Chem.* **119**, 8343–8345 (2007).
98. Dehn, R. *et al.* Molekulare Grundlage für die Biosynthese von Elansolid: Beweise für eine einzigartige, durch ein Chinonmethid initiierte intramolekulare Diels-Alder-Cycloaddition/Makrolactonisierung. *Angew. Chem.* **123**, 3968–3973 (2011).
99. Less, S. L., Handa, S., Leadlay, P. F., Dutton, C. J. & Staunton, J. Biosynthesis of Tetronasin: Part 5. Novel Fluorinated and Non-Fluorinated Analogues of Tetronasin via Intact Incorporation of Di-, Tri- and Tetraketide Analogue Precursors. *Tetrahedron Lett.* **37**, 3511–3514 (1996).
100. Less, S. L. *et al.* Biosynthesis of Tetronasin: Part 6. Preparation of Structural Analogues of the Diketide and Triketide Biosynthetic Precursors to Tetronasin. *Tetrahedron Lett.* **37**, 3515–3518 (1996).
101. Less, S. L., Leadlay, P. F., Dutton, C. J. & Staunton, J. Biosynthesis of Tetronasin: Part 7. Preparation of Structural Analogues of the Tetraketide Biosynthetic Precursor to Tetronasin. *Tetrahedron Lett.* **37**, 3519–3520 (1996).
102. Khosla, C., Gokhale, R. S., Jacobsen, J. R. & Cane, D. E. Tolerance and Specificity of Polyketide Synthases. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 219–253 (1999).
103. Wu, J., Kinoshita, K., Khosla, C. & Cane, D. E. Biochemical Analysis of the Substrate Specificity of the β -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase Domain of Module 2 of the Erythromycin Polyketide Synthase. *Biochemistry* **43**, 16301–16310 (2004).
104. Nguyen, T. *et al.* Exploiting the Mosaic Structure of *trans*-Acyltransferase Polyketide Synthases for Natural Product Discovery and Pathway Dissection. *Natural Biotech.* **26**, 225–233 (2008).
105. Frank, S. Chemische und molekularbiologische Studien am Psymberin Gencluster. *Diplomarbeit*, Universität Bonn (2010)
106. Brandl, M. *et al.* The Biosynthesis of 3-(*trans*-2-Nitrocyclopropyl)alanine, a Constituent of the Signal Metabolite Hormaomycin. *Eur. J. Chem. Soc.* **2005**, 123–135 (2005).
107. Jez, J. M., Ferrer, J.-L., Bowman, M. E., Dixon, R. A. & Noel, J. P. Dissection of Malonyl-Coenzyme A Decarboxylation from Polyketide Formation in the Reaction Mechanism of a Plant Polyketide Synthase. *Biochemistry* **39**, 890–902 (2000).

108. Kuhn, R. & Quadbeck, G. Darstellung und Wirkungen von Acetyl-Derivaten des Cysteamins. *Chem. Ber.* **84**, 844–847 (1951).
109. Bonnett, S. A., Papireddy, K., Higgins, S., del Cardayre, S. & Reynolds, K. A. Functional Characterization of an NADPH Dependent 2-Alkyl-3-ketoalkanoic Acid Reductase Involved in Olefin Biosynthesis in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biochemistry* **50**, 9633–9640 (2011).
110. Nakahata, T., Itagati, N., Arai, T., Sugie, H. & Kuwahara, S. Synthesis of the Sex Pheromone of the Citrus Mealybug, *Pseudococcus cryptus*. *Biochemistry* **67**, 2627–2631 (2003).
111. Krueger, R. C. Crystalline Acetoacetic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 5536 (1952).
112. Grünschow, S., Buchholz, T. J., Seufert, W., Dordick, J. S. & Sherman, D. H. Substrate Profile Analysis and ACP-Mediated Acyl Transfer in *Streptomyces coelicolor* Type III Polyketide Synthases. *ChemBioChem* **8**, 863–868 (2007).
113. Gilbert, I. H. *et al.* Synthesis of β -Keto and α,β -Unsaturated *N*-Acetylcysteamine Thioesters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **5**, 1587–1590 (1995).
114. Zhou, M. & Gomez-Sanchez, C. Universal TA Cloning. *Curr. Iss. Mol. Biol.* **2**, 1–7 (2000).
115. Kohlhaas, C. Chemisch-molekularbiologische Studien zur Substratspezifität an Ketosynthesedomänen in *trans*-AT-Polyketidsynthasen. *Dissertation*, Universität Bonn (2013).
116. Jenner, M. *et al.* Substrate specificity in ketosynthase domains from *trans*-AT polyketide synthases. *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* **52**, 1143–1147 (2013).
117. Cox, R. J. *et al.* Post-Translational Modification of Heterologously Expressed Streptomyces Type II Polyketide Synthase Acyl Carrier Proteins. *FEBS Lett.* **405**, 267–272 (1997).
118. Crosby, J. *et al.* Acylation of Streptomyces Type II Polyketide Synthase Acyl Carrier Proteins. *FEBS Lett.* **433**, 132–138 (1998).
119. Jensen, K. *et al.* Polyketide Proofreading by an Acyltransferase-Like Enzyme. *Chem. Biol.* **19**, 329–339 (2012).
120. Jeong, Y. C., Hwang, S. K., Ahn, K. H. Synthesis of Enantiomerically Pure *N*-Substituted 4-Hydroxypyrrolidin-2-one Derivatives. *Bull. Korean. Chem. Soc.* **26**, 826–828 (2005).
121. Tanikaga, R., Hosoya, K. & Kaji, A. Ready Nucleophilic Ring Opening of β -Epoxy-Sulphone, -Sulphoxide, and -Ester With Grignard Reagents. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 836–837 (1986).
122. Tokunaga, M., Larrow, J. F., Kakiuchi, F. & Jacobsen, E. N. Asymmetric Catalysis with Water: Efficient Kinetic Resolution of Terminal Epoxides by Means of Catalytic Hydrolysis. *Science* **277**, 936–938 (1997).

123. Schmid, C. R. *et al.* Synthesis of 2,3-*O*-Isopropylidene-*D*-glyceraldehyde in High Chemical and Optical Purity: Observations on the Development of a Practical Bulk Process. *J. Org. Chem.* **56**, 4056–4058 (1991).
124. Smith, A. B., Chen, S. S.-Y., Nelson, F. C., Reichert, J. M. & Salvatore, B. A. Total Syntheses of (+)-Acutiphycin and (+)-*trans*-20,21-Didehydroacutiphycin. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 10935–10946 (1997).
125. Wang, M., Opare, P. & Boddy, C. N. Polyketide Synthase Thioesterases Catalyze Rapid Hydrolysis of Peptidyl Thioesters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 1413–1415 (2009).
126. Oiry, J. *et al.* Synthesis and Radioprotective Activity of New Cysteamine and Cystamine Derivatives. *J. Med. Chem.* **29**, 2217–2225 (1986).
127. Miyashita, M., Yoshikoshi, A. & Grieco, P. A. Pyridinium *p*-Toluenesulfonate. A Mild and Efficient Catalyst for the Tetrahydropyranylation of Alcohols. *J. Org. Chem.* **42**, 3772–3774 (1977).
128. Yoshino, T. *et al.* Total Synthesis of an Enantiomeric Pair of FR900482. *Tetrahedron* **53**, 10239–10252 (1997).
129. Horita, K., Yoshioka, T., Tanaka, T., Oikawa, Y. & Yonemitsu, O. On the Selectivity of Deprotection of Benzyl, MPM (4-Methoxybenzyl) and DMPM (3,4-Dimethoxybenzyl) Protecting Groups for Hydroxy Functions. *Tetrahedron* **42**, 3021–3028 (1986).
130. Jan, L. *p*-Methoxybenzyl Ethers as Acid-Labile Protecting Groups in Oligosaccharide Synthesis. *Synlett* 523–524 (1995).
131. Nakajima, N. & Abe, R. 3-Methoxybenzyl (3-MPM) and 3,5-Dimethoxybenzyl (3,5-DMPM) Protecting Groups For the Hydroxy Function Less Readily Removable Than 4-Methoxybenzyl (MPM) And 3,4-Dimethoxybenzyl (DMPM) Protecting Groups by DDQ Oxidation. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 4244 (1988).
132. Malakhov, M. *et al.* SUMO Fusions and SUMO-Specific Protease for Efficient Expression and Purification of Proteins. *J. Struc. Funct. Genomics* **5**, 75–86 (2004).
133. Li, S., Anzai, Y., Kinoshita, K., Kato, F. & Sherman, D. H. Functional Analysis of MycE and MycF, Two *O*-Methyltransferases Involved in the Biosynthesis of Mycinamicin Macrolide Antibiotics. *ChemBioChem* **10**, 1297–1301 (2009).
134. Hitchman, T. S., Crosby, J., Byrom, K. J., Cox, R. J. & Simpson, T. J. Catalytic self-acylation of type II polyketide synthase acyl carrier proteins. *Chem. Biol.* **5**, 35–47 (1998).
135. Evans, D. A. & Black, W. C. Total synthesis of (+)-A83543A [(+)-lepicidin A]. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 4497–4513 (1993).
136. Altschul, S. F. & Koonin, E. V. Iterated Profile Searches With PSI-BLAST—a Tool for Discovery in Protein Databases. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 444–447 (1998).
137. Hegg, E. L. & Jr, L. Q. The 2-His-1-Carboxylate Facial Triad — An Emerging Structural Motif in Mononuclear Non-Heme Iron(II) Enzymes. *Eur. J. Biochem.* **250**, 625–629 (1997).

138. Rose, N. R., McDonough, M. A., King, O. N. F., Kawamura, A. & Schofield, C. J. Inhibition of 2-Oxoglutarate Dependent Oxygenases. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 4364–4397 (2011).
139. Que Lawrence & Ho, R. Y. N. Dioxygen Activation by Enzymes with Mononuclear Non-Heme Iron Active Sites. *Chem. Rev.* **96**, 2607–2624 (1996).
140. Yin, X. & Zabriskie, T. M. VioC is a Non-Heme Iron, α -Ketoglutarate-Dependent Oxygenase that Catalyzes the Formation of 3S-Hydroxy-L-Arginine during Viomycin Biosynthesis. *ChemBioChem* **5**, 1274–1277 (2004).
141. Flashman, E., Davies, S. L., Yeoh, K. K. & Schofield, C. J. Investigating the Dependence of the Hypoxia-Inducible Factor Hydroxylases (Factor Inhibiting HIF and Prolyl Hydroxylase Domain 2) on Ascorbate and Other Reducing Agents. *Biochem. J.* **427**, 135–142 (2010).
142. Van Lanen, S. G., Lin, S., Horsman, G. P. & Shen, B. Characterization of SgcE6, the Flavin Reductase Component Supporting FAD-Dependent Halogenation and Hydroxylation in the Biosynthesis of the Eneidyne Antitumor Antibiotic C-1027. *FEMS Microbiol. Lett.* **300**, 237–241 (2009).
143. Liu, W., Christenson, S. D., Standage, S. & Shen, B. Biosynthesis of the Eneidyne Antitumor Antibiotic C-1027. *Sci.* **297**, 1170–1173 (2002).
144. Sudek, S. *et al.* Identification of the Putative Bryostatin Polyketide Synthase Gene Cluster from “*Candidatus endobugula sertula*”, the Uncultivated Microbial Symbiont of the Marine Bryozoan *bugula neritina*. *J. Nat. Prod.* **70**, 67–74 (2006).
145. Caffrey, P. The Stereochemistry of Ketoreduction. *Chem. Biol.* **12**, 1060–1062 (2005).
146. Ragoussis, V. & Theodorou, V. Stereoselective Access to Tetrahydropyranylacetic Acid Derivatives. Simple Synthesis of (+)-(S,S)-(cis-6-Methyltetrahydropyran-2-yl)acetic acid. *Synthesis* 84–86 (1993).
147. Kennedy, J., McCorkindale, N. J. & Raphael, R. A. A New Synthesis of Queen Substance. *J. Am. Chem. Soc.* 3813–3815 (1961).
148. Ragoussis, N. Modified Knoevenagel Condensations. Synthesis of (E)-3-Alkenoic Acids. *Tetrahedron Lett.* **28**, 93–96 (1987).
149. Jones, G., The Knoevenagel Condensation. *Org. React.* **226** (1967).
150. Gulder, T. M., Freeman, M. & Piel, J., The Catalytic Diversity of Multimodular Polyketide Synthases: Natural Product Biosynthesis Beyond Textbook Assembly Rules. *Top. Curr. Chem.* **1–53** (2011).
151. Pöplau, P., Frank, S., Morinaka, B. I. & Piel, J. An Enzymatic Domain for the Formation of Cyclic Ethers in Complex Polyketides. *Angew. Chemie Int. Ed.* **52**, 13215–13218 (2013).

-
152. Cai, X. Molecular Analysis of Genes Involved in the Biosynthesis and Regulation of Hormaomycin, an Exceptionally Complex Bacterial Signaling Metabolite. *Dissertation* (2013).
153. Kollonitsch, J., Rosegay, A. & Doldouras, G. Reactions in Strong Acids. New Concept in Amino Acid Chemistry: C-Derivatization of Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1857–1858 (1964).
154. Kollonitsch, J., Scott, A. N. & Doldouras, G. A. C-Derivatization of Amino Acids. Synthesis and Absolute Configuration of 3-Methylproline. *cis—trans* Isomers with Unusual Vicinal Proton Coupling. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 3624–3626 (1966).
155. Combettes, L. E. *et al.* Synthesis of 3-Fluoropyrrolidines and 4-Fluoropyrrolidin-2-ones from Allylic Fluorides. *Chem.-Eur. J.* **18**, 13126–13132 (2012).
156. Bur, D. Bridged spiro[2.4]heptane-5-carboxamide derivatives as ALX and FPRL2 receptor agonists and their preparation and use for the treatment of diseases. *PCT Int. Appl.* **2009067692**, (2010).
157. Lygo, B. & Allbutt, B. Asymmetric PTC Alkylation of Glycine Imines: Variation of the Imine Ester Moiety. *Synlett* **2004**, 326–328 (2004).
158. Sellanes, D. *et al.* Preparation and Biological Evaluation of Key Fragments and Open Analogs of Scleritodermin A. *Tetrahedron* **66**, 5384–5395 (2010).
159. Huber, T., Manzenrieder, F., Kuttruff, C. A., Dorner-Ciossek, C. & Kessler, H. Prolonged Stability by Cyclization: Macrocyclic Phosphino Dipeptide Isostere Inhibitors of β -Secretase (BACE1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 4427–4431 (2009).
160. Iwata, M. & Kuzuhara, H. Synthesis and Characterization of Macrocyclic Polyaza(2,5)pyridinophanes Possessing Vitamin B6 Functionality. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **59**, 1031–1036 (1986).
161. Bergmann, M., Zervas, L. & Silberkweit, E. Über Glucosaminsäure und ihre Desaminierung. *Chem. Ber.* **64**, 2428–2436 (1931).
162. Clarke, C. T., Jones, J. H. & Walker, R. Reaction of 2-Amino-2-Deoxy-D-Gluconic Acid With Hot Acetic Anhydride-Sodium Acetate. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1* 1001–1003 (1976).
163. Horton, D., Thomson, J. K., Varela, O., Nin, A. & de Lederkremer, R. M. Confirmation of the Structures of the Products Obtained on Acylation of 2-Amino-2-Deoxy-d-Gluconic Acid. *Carbohydr. Res.* **193**, 49–60 (1989).
164. Pasunooti, K. K. *et al.* Synthesis of 4-Mercapto-L-Lysine Derivatives: Potential Building Blocks for Sequential Native Chemical Ligation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 6268–6271 (2009).
165. Roberts, S. J., Morris, J. C., Dobson, R. C. J. & Gerrard, J. A. The Preparation of (S)-Aspartate Semi-Aldehyde Appropriate for Use in Biochemical Studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 265–267 (2003).

166. Bergmeier, S. C., Cobas, A. A. & Rapoport, H. Chirospecific Synthesis of (1*S*,3*R*)-1-Amino-3-(hydroxymethyl)cyclopentane, Precursor for Carbocyclic Nucleoside Synthesis. *J. Org. Chem.* **58**, 2369–2376 (1993).
167. Qu, W. *et al.* Synthesis of Optically Pure 4-Fluoro-Glutamines as Potential Metabolic Imaging Agents for Tumors. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 1122–1133 (2010).
168. Ramsamy, K. Synthesis of *N*-*t*-Boc-*L*-α-aminoadipic Acid 1-*t*-Butyl 6-Ethyl Ester from *L*-Aspartic Acid: A New Route to *L*-α-Aminoadipic Acid. *Synlett* 42–43 (1982).
169. Kanchanabancha, C. *et al.* Unusual Acetylation–Elimination in the Formation of Tetronate Antibiotics. *Angew. Chem. Int. Ed.* **125**, 5897–5900 (2013).
170. Hünig, S., Kreitmeier, P., Märkl, G. & Sauer, J. *Arbeitsmethoden in der organischen Chemie*. 252–272 (2006).
171. Gottlieb, H. E., Kotlyar, V. & Nudelman, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *J. Org. Chem.* **62**, 7512–7515 (1997).
172. Karbaum, P. Untersuchungen zur Radikalischen Regiodivergenten Epoxidöffnung. *Dissertation*, Universität Bonn (2011).
173. Swartz, M. E. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction. *Sep. Sci. Re-Defined, LCGC Suppl.* **8**, (2005).
174. Kiefer, P., Schmitt, U. & Vorholt, J. A. eMZed: An Open Source Framework in Python For Rapid and Interactive Development of LC/MS Data Analysis Workflows. *Bioinforma.* **29**, 963–964 (2013).
175. Izumikawa, M., Cheng, Q. & Moore, B. S. Priming Type II Polyketide Synthases via a Type II Nonribosomal Peptide Synthetase Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 1428–1429 (2006).

6. Anhang

6.1 NMR-Spektren

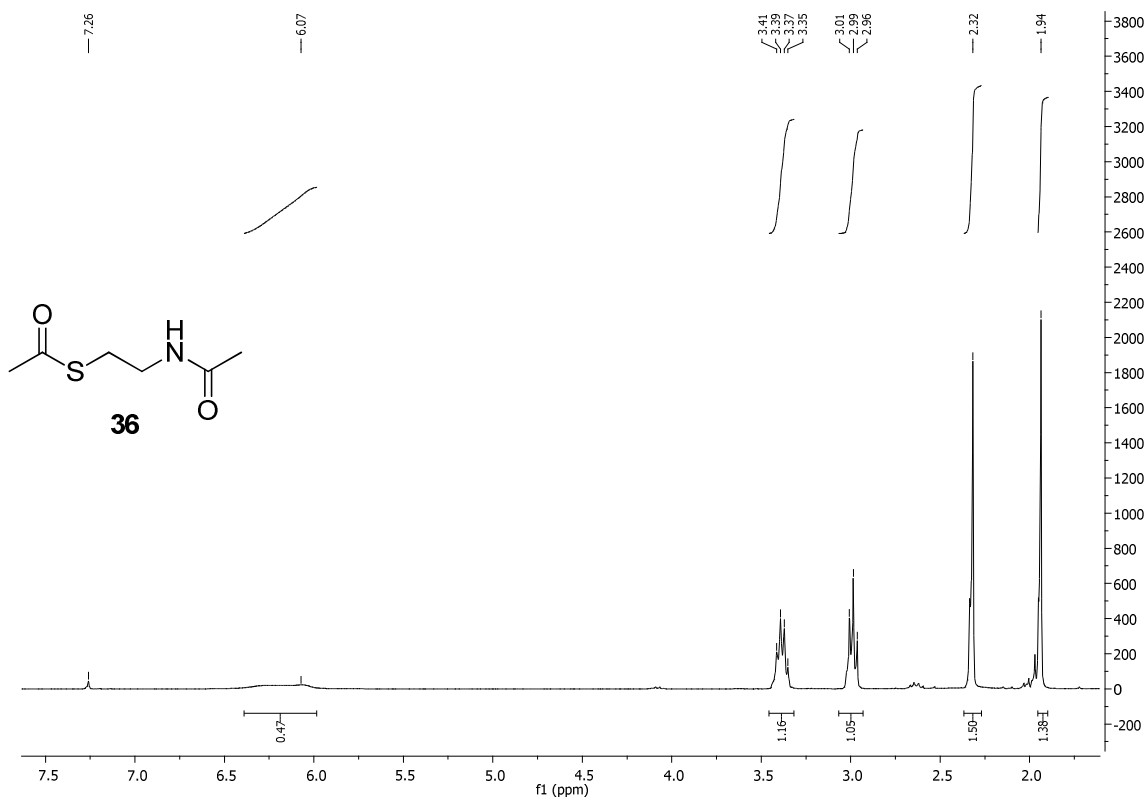


Abbildung 159: ¹H-NMR Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) von *S*-Acetyl-*N*-acetylcysteamin (**36**).

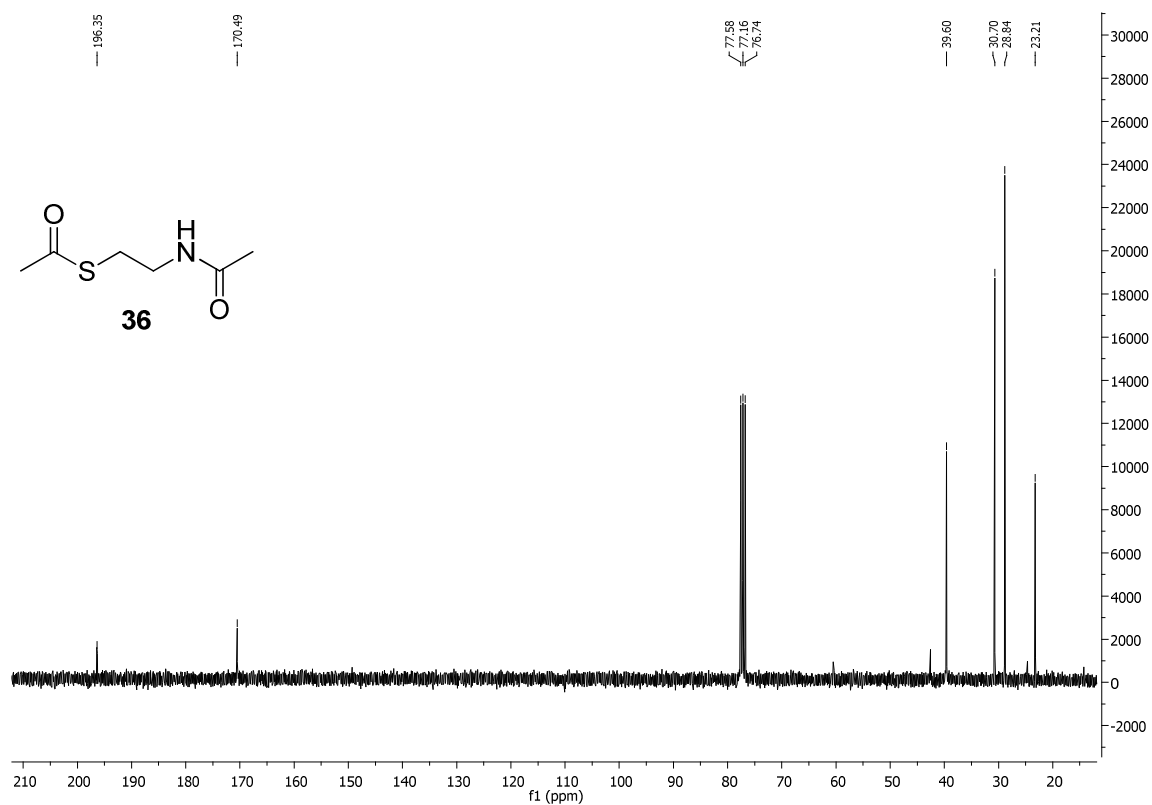


Abbildung 160: ^{13}C -NMR Spektrum (CDCl_3 , 100 MHz) von *S*-Acetyl-*N*-acetylcysteamin (36).

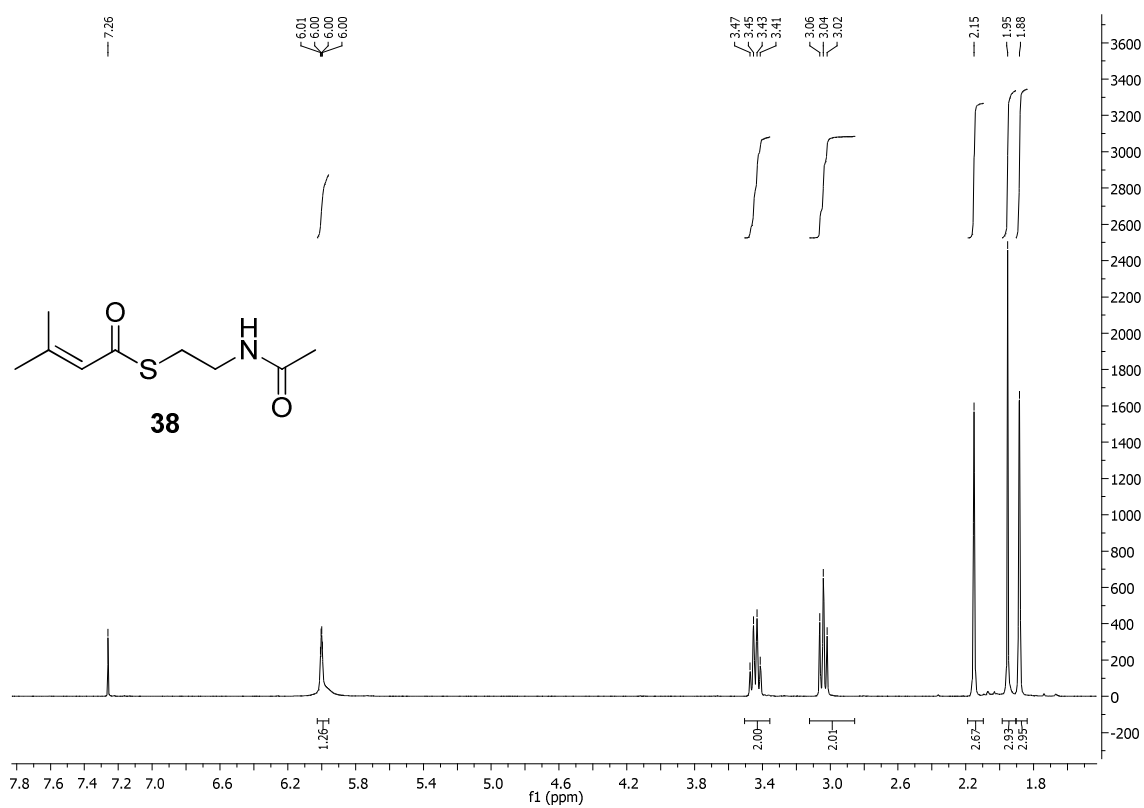


Abbildung 161: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz) von *S*-(3-Methyl-3-buten)-*N*-acetylcysteamin (38).

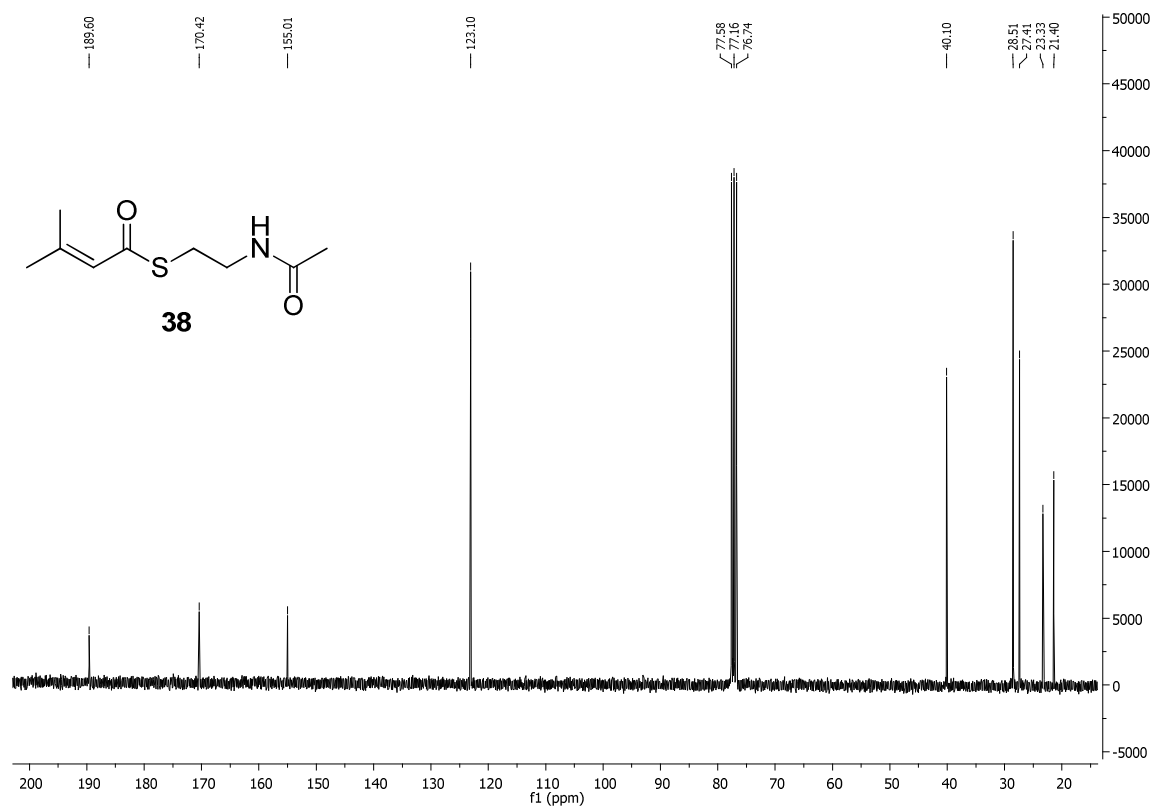


Abbildung 162: ¹³C-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von *S*-(3-Methyl-3-buten)-*N*-acetylcysteamin (**38**).

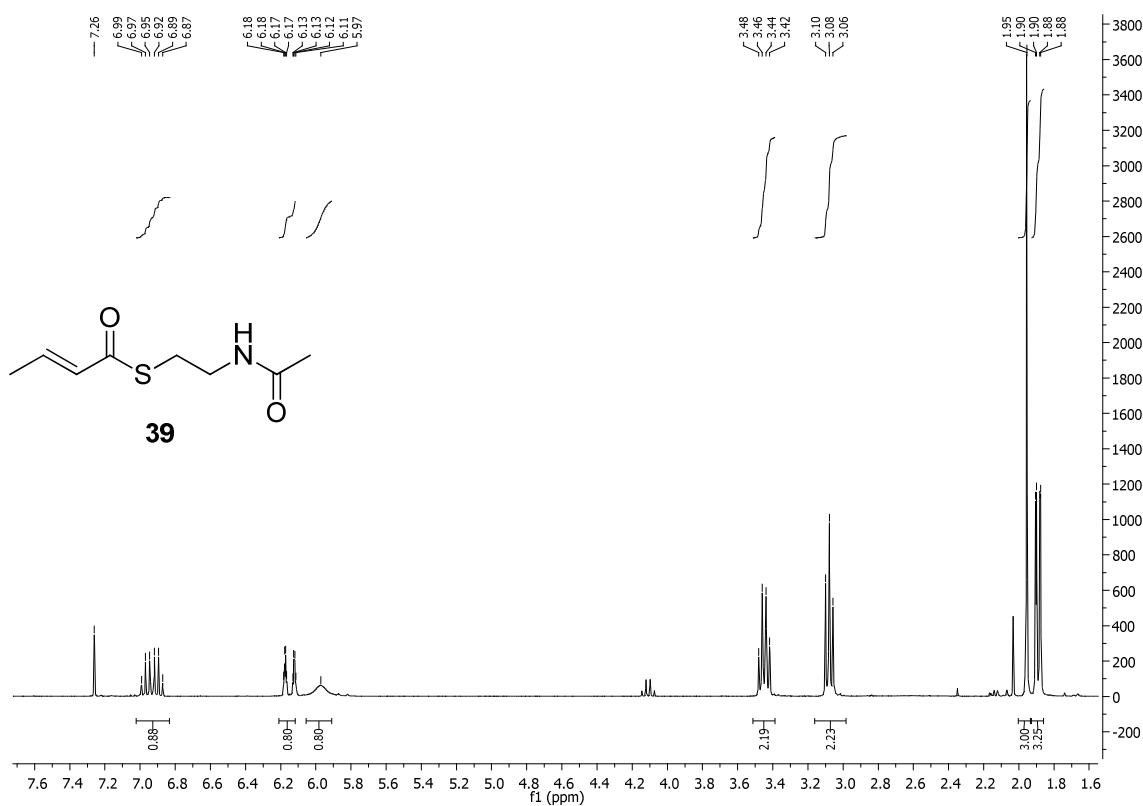


Abbildung 163: ¹H-NMR Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) von *S*-Crotonyl-*N*-acetylcysteamin (**39**).

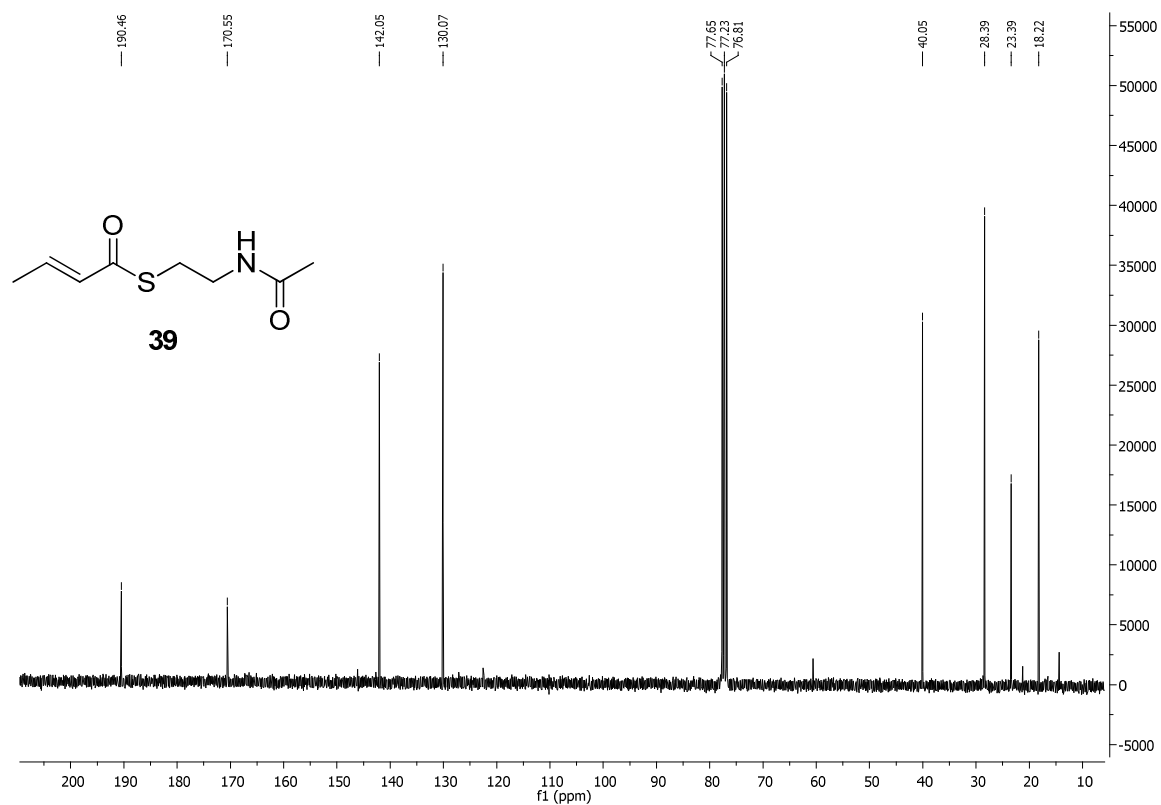


Abbildung 164: ¹³C-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von *S*-Crotonyl-*N*-acetylcysteamin (**39**).

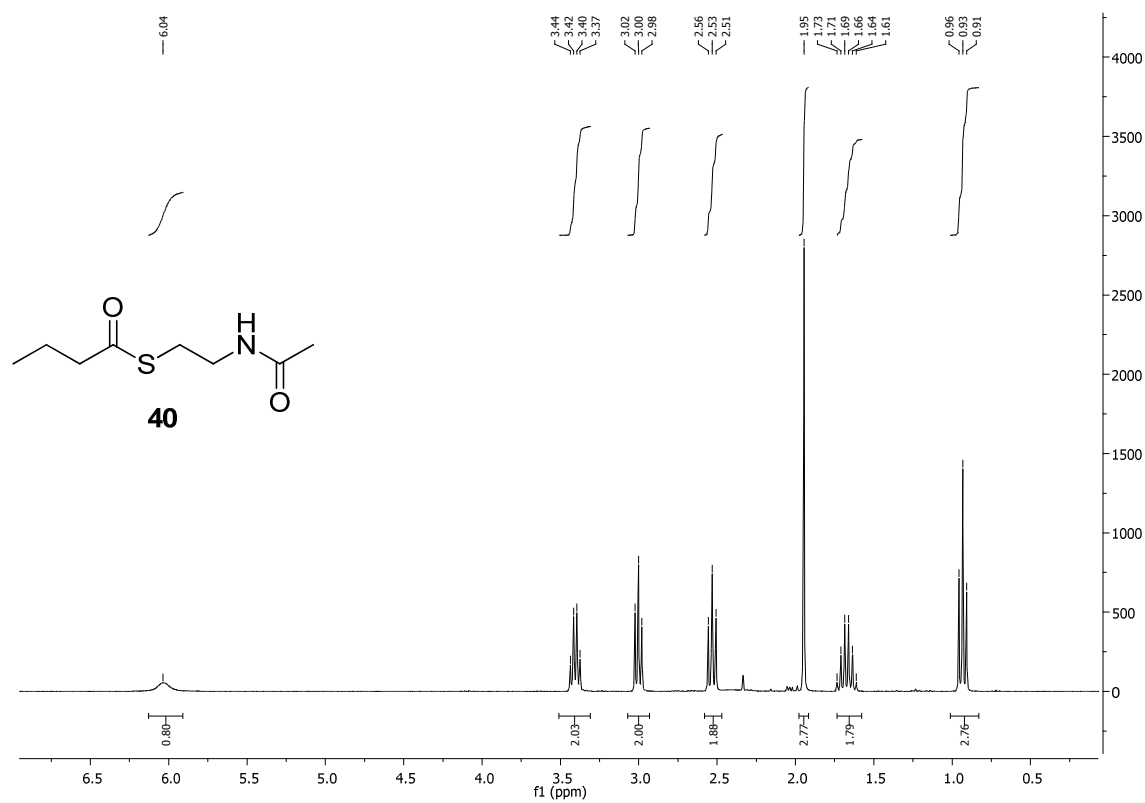


Abbildung 165: ¹H-NMR Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) von *S*-*n*-Butanoyl-*N*-acetylcysteamin (**40**).

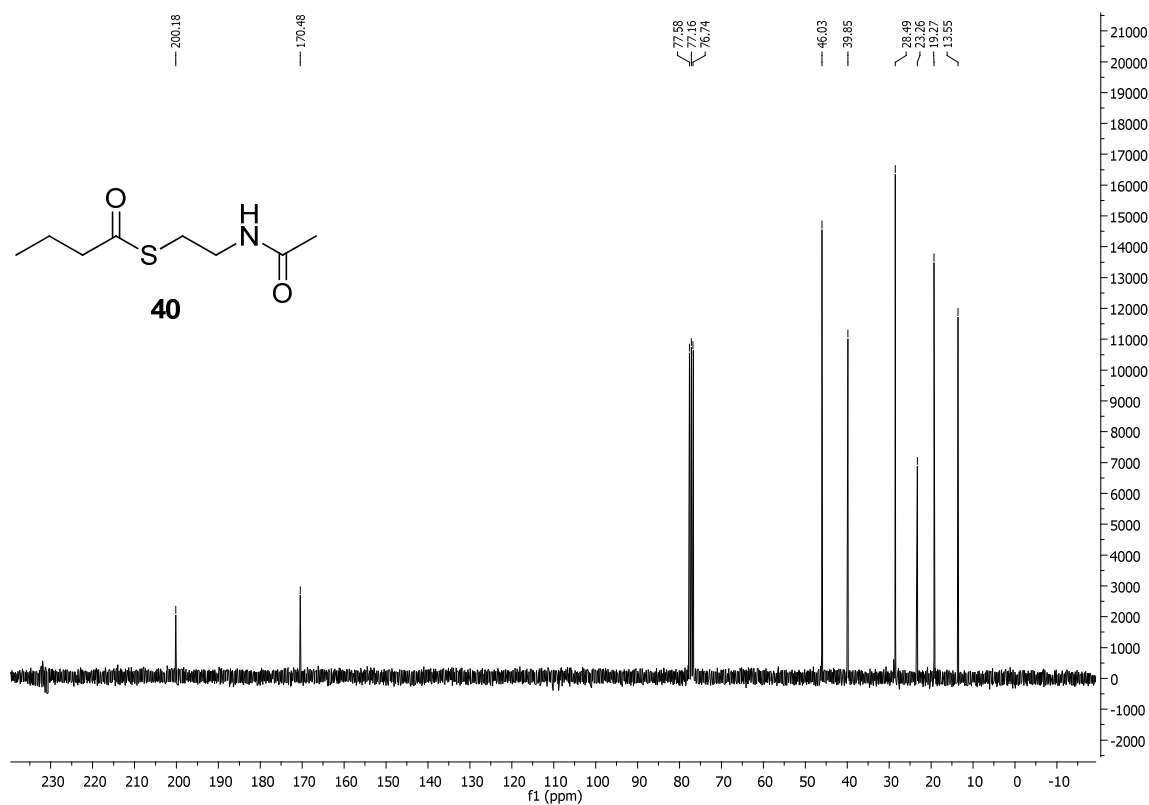


Abbildung 166: ¹³C-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von *S*-*n*-Butanoyl-*N*-acetylcysteamin (**40**).

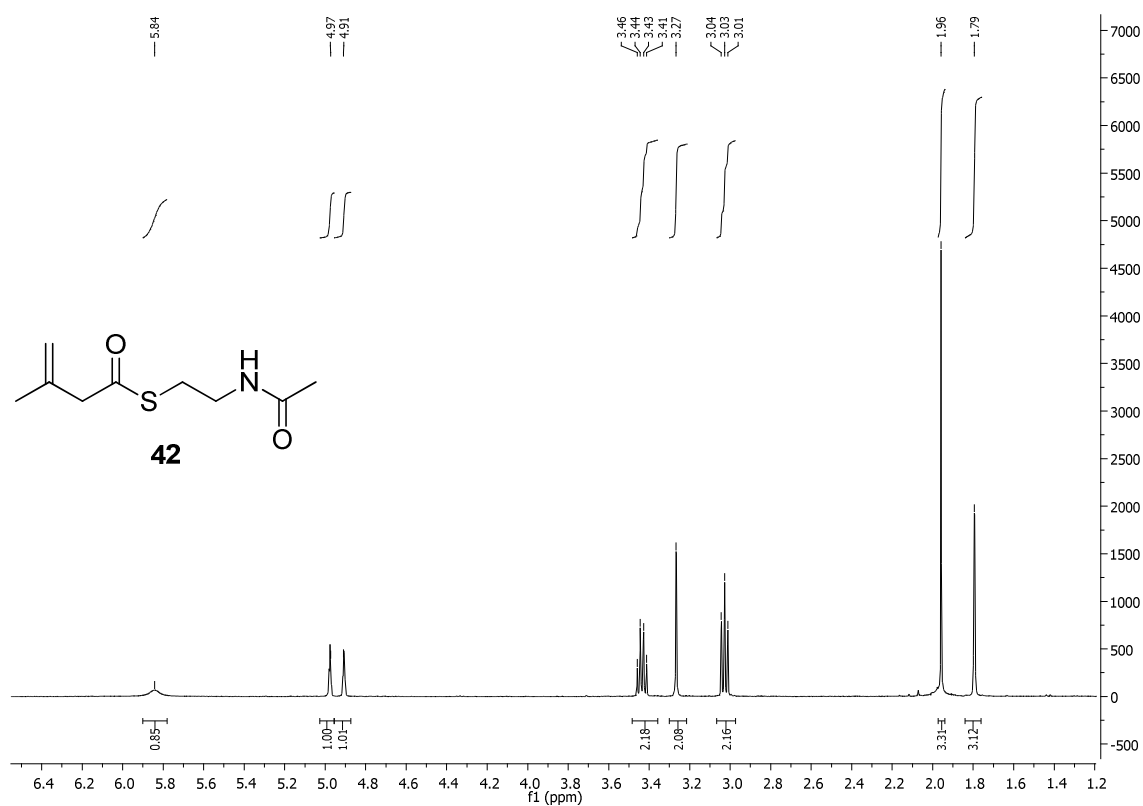


Abbildung 167: ¹H-NMR Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) von *S*-(3-Methyl-3-buten)-*N*-acetylcysteamin (**42**).

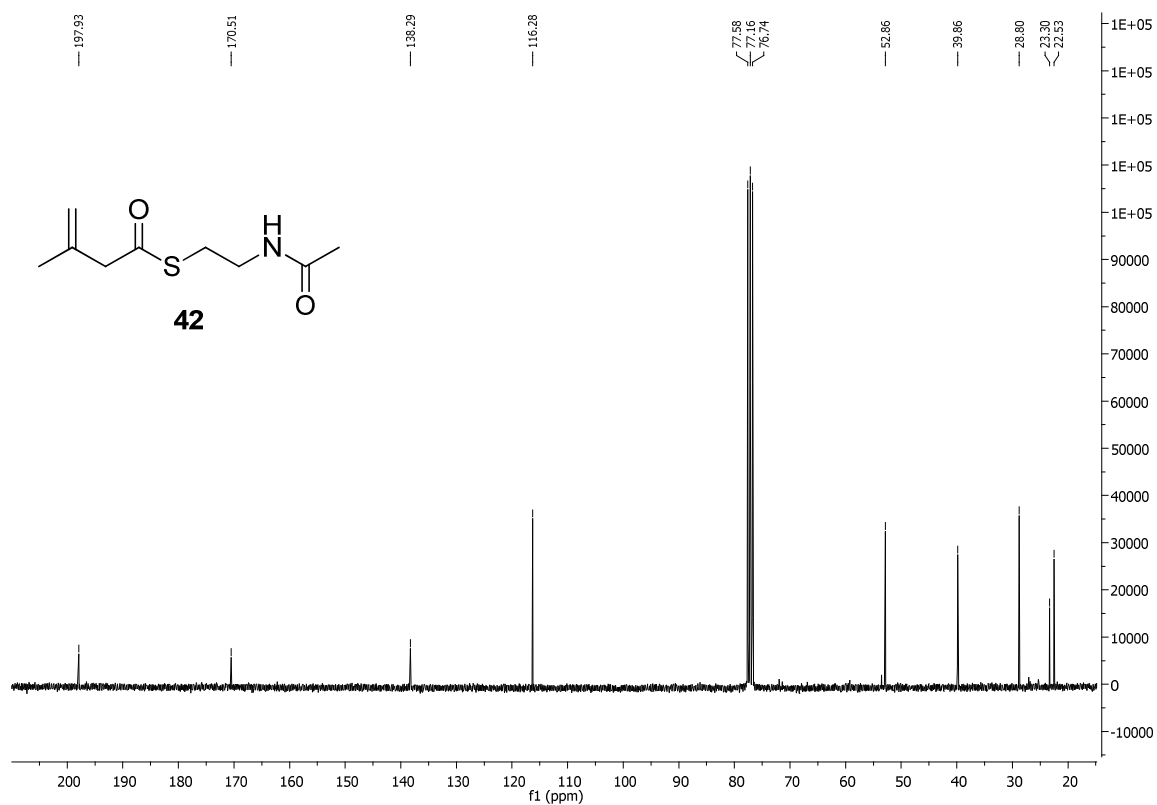


Abbildung 168: ¹³C-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von *S*-(3-Methyl-3-buten)-*N*-acetylcysteamin (**42**).

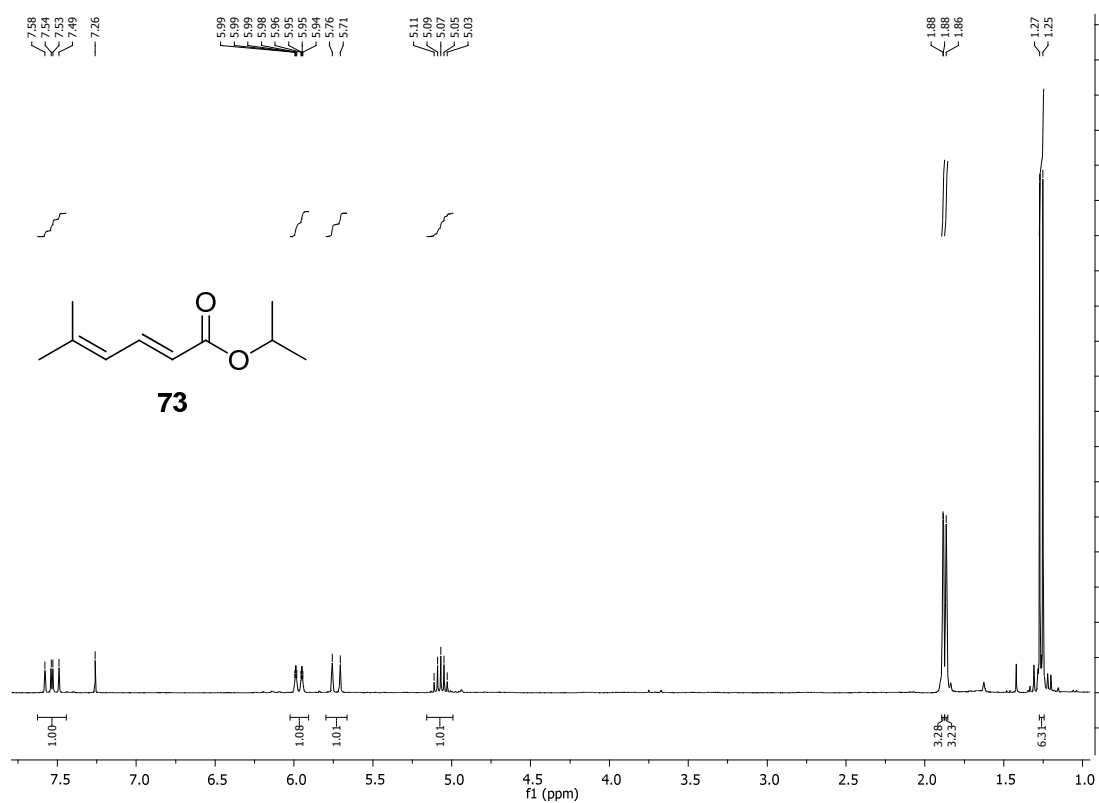


Abbildung 169: ¹H-NMR Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) von (*E*)-Isopropyl-5-methylhexa-2,4-dienoat (**73**).

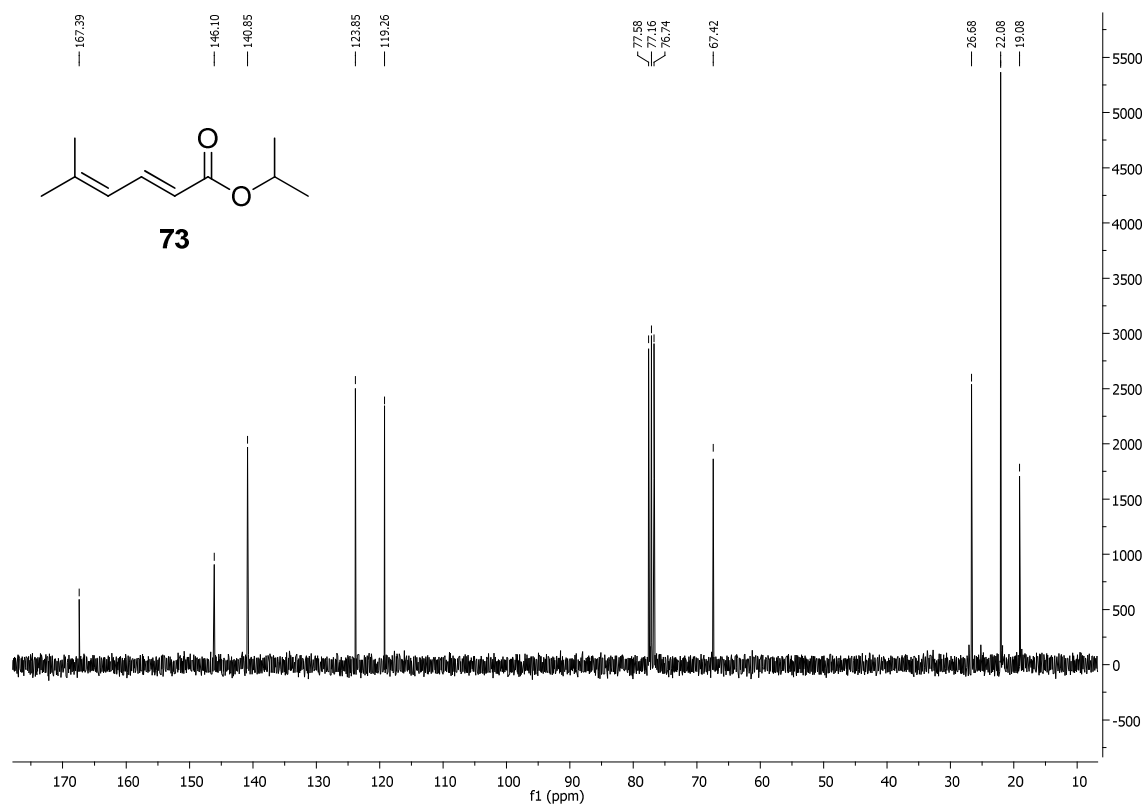


Abbildung 170: ¹³C-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von (*E*)-Isopropyl-5-methylhexa-2,4-dienoat (73).

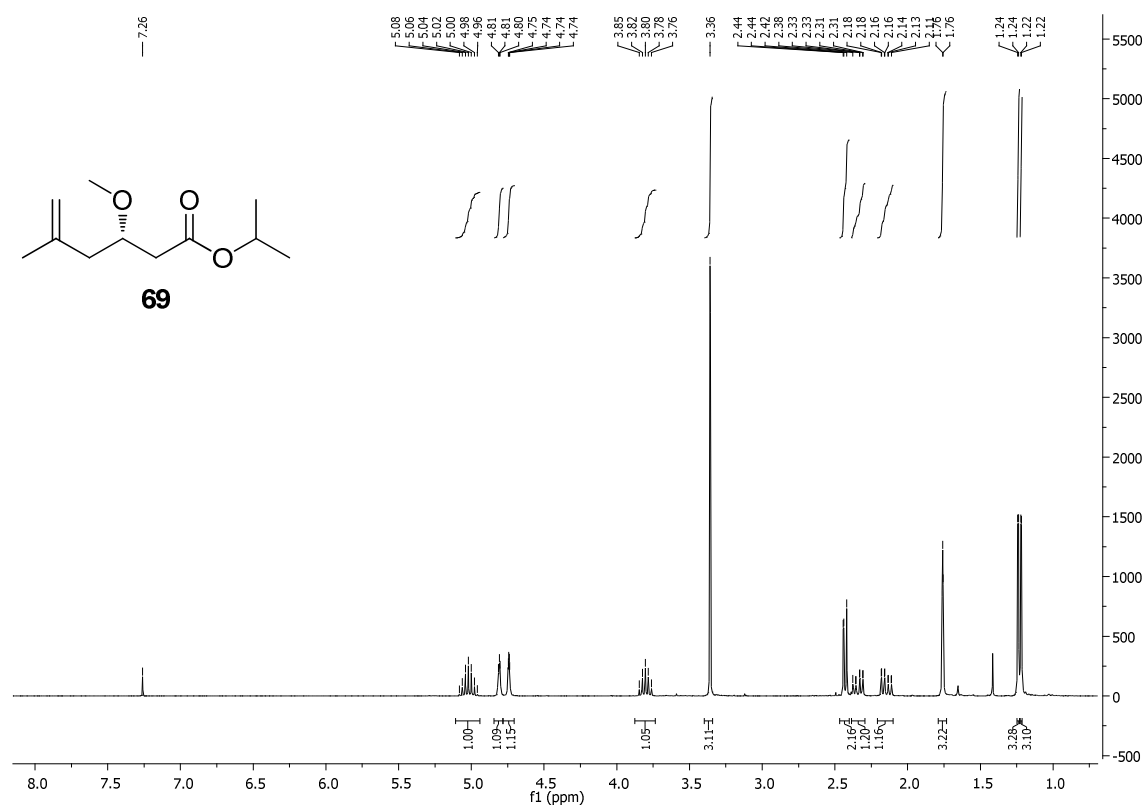


Abbildung 171: ¹H-NMR Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) von (*3S*)-Isopropyl-3-methoxy-5-methylhex-5-ensäureester (69).

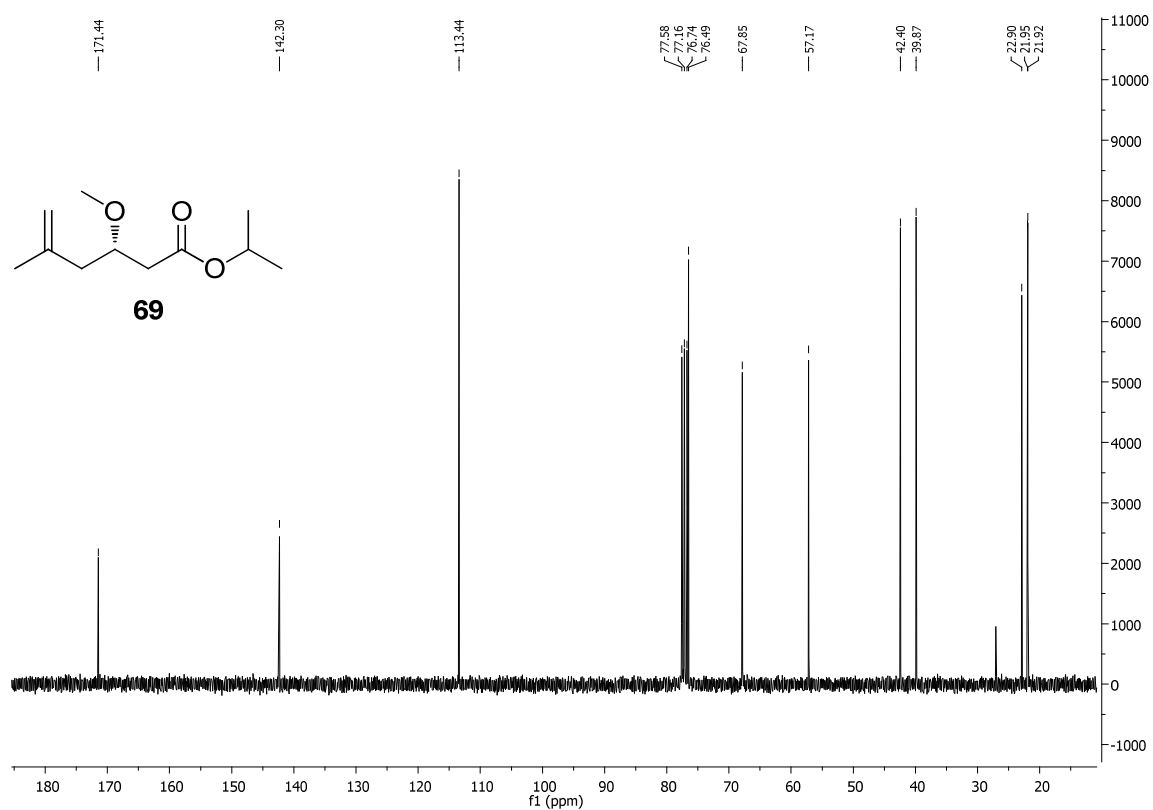


Abbildung 172: ¹³C-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von (3*S*)-Isopropyl-3-methoxy-5-methylhex-5-ensäureester (69).

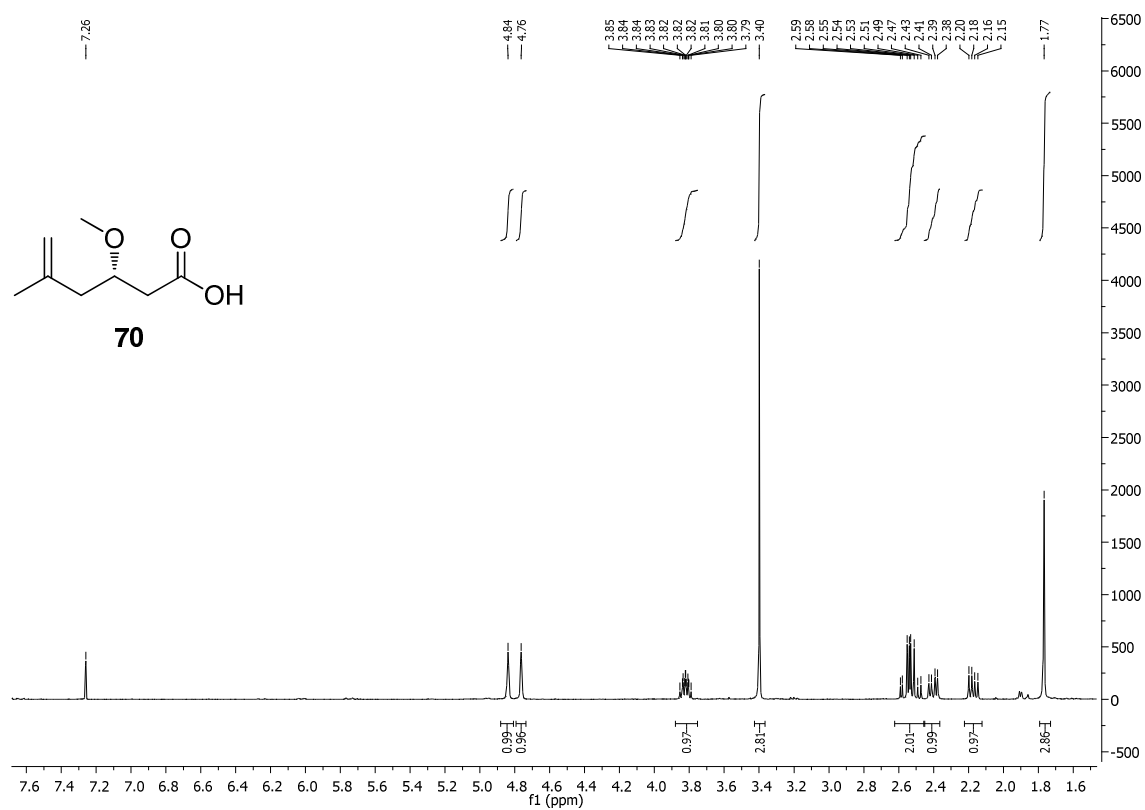


Abbildung 173: ¹H-NMR Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) von (3*S*)-3-Methoxy-5-methylhex-5-ensäure (70).

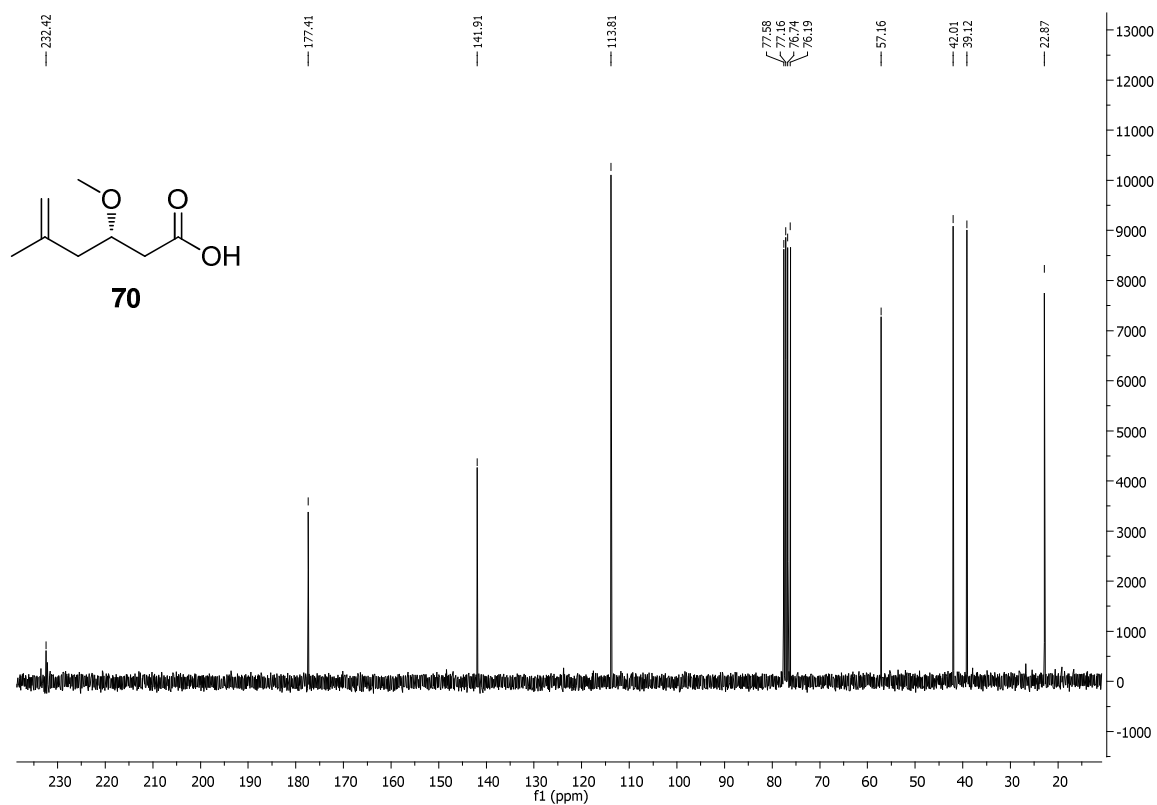


Abbildung 174: ¹³C-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von (3S)-3-Methoxy-5-methylhex-5-ensäure (70).

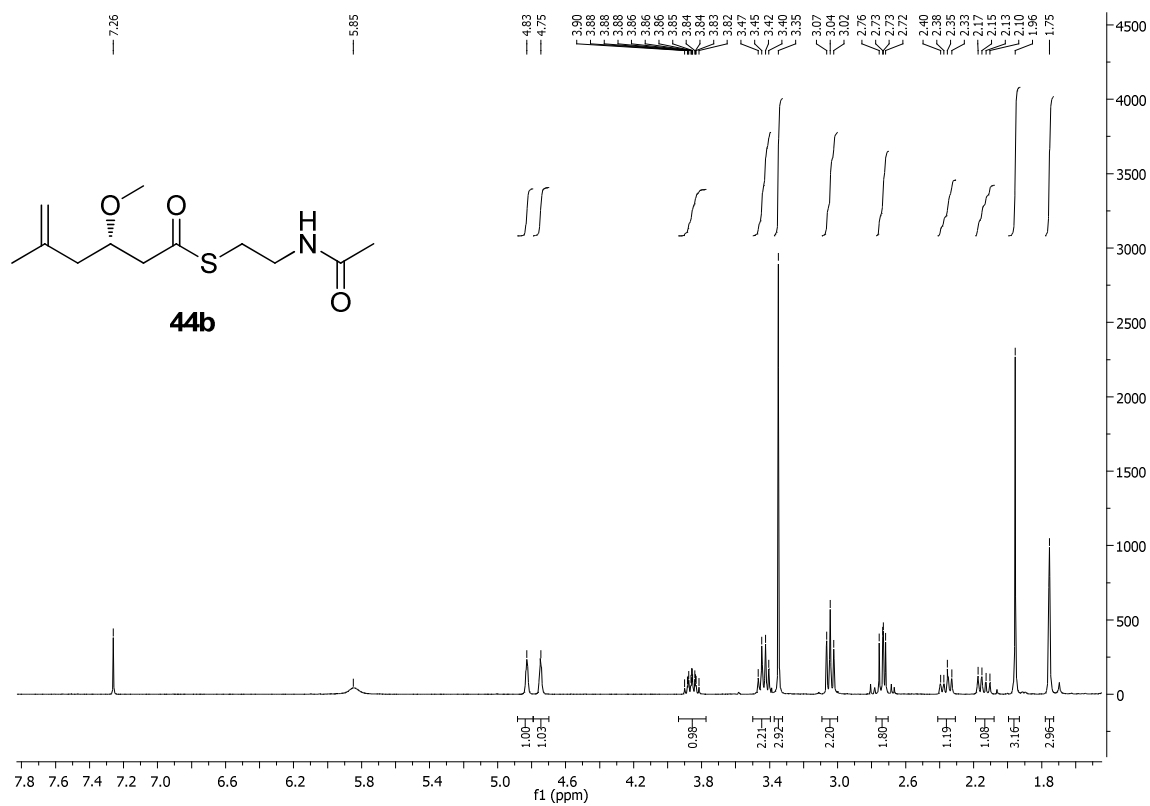


Abbildung 175: ¹H-NMR Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) von (3S)-3-Methoxy-5-methylhex-5-ensäureacetamidoethylthioester (44b).

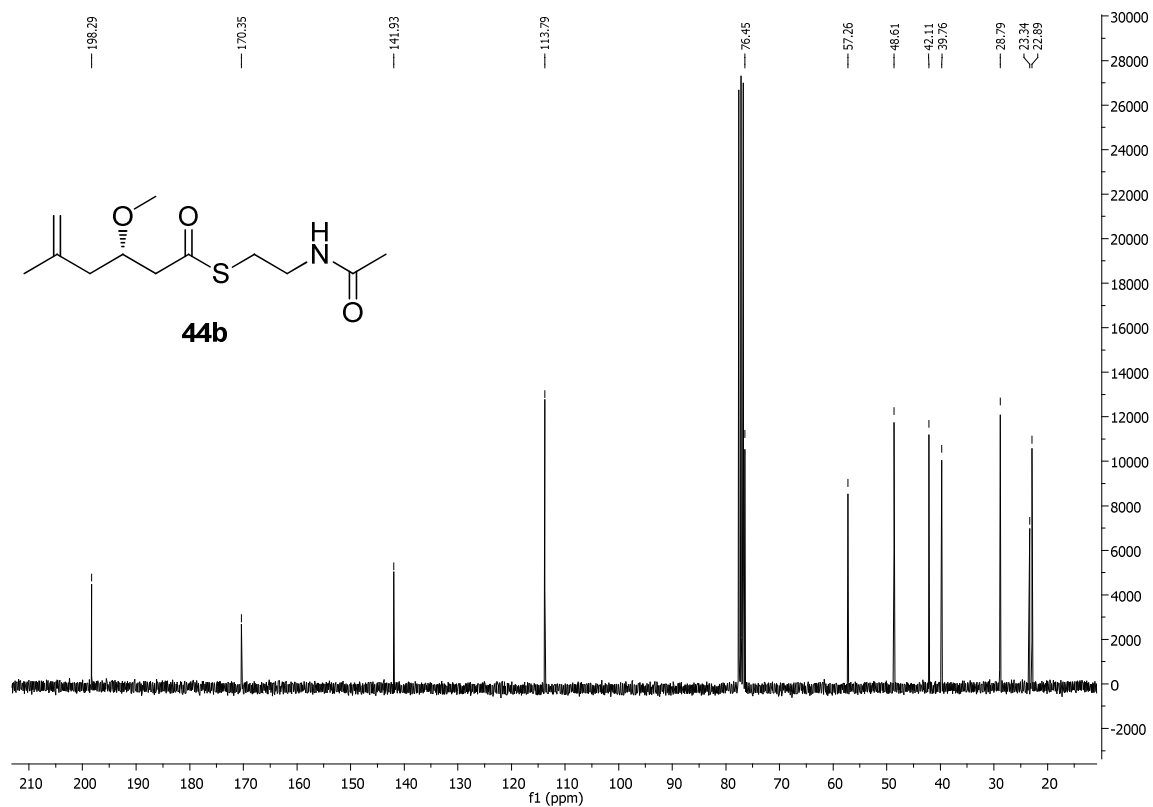


Abbildung 176: ¹³C-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von (3*S*)-3-Methoxy-5-methylhex-5-ensäureacetamidoethylthioester (**44b**).

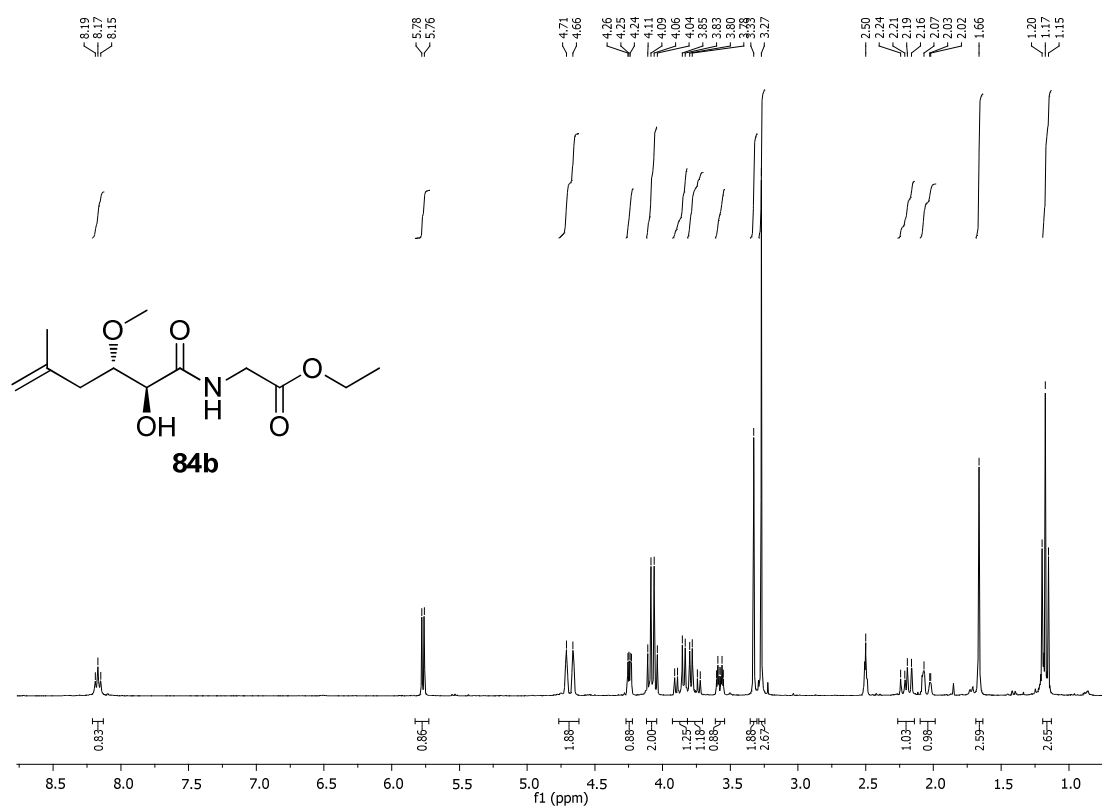


Abbildung 177: ¹H-NMR Spektrum (DMSO-*d*₆, 400 MHz) von Ethyl-2-((2*S*,3*S*)-2-hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-enamido)acetat (**84b**).

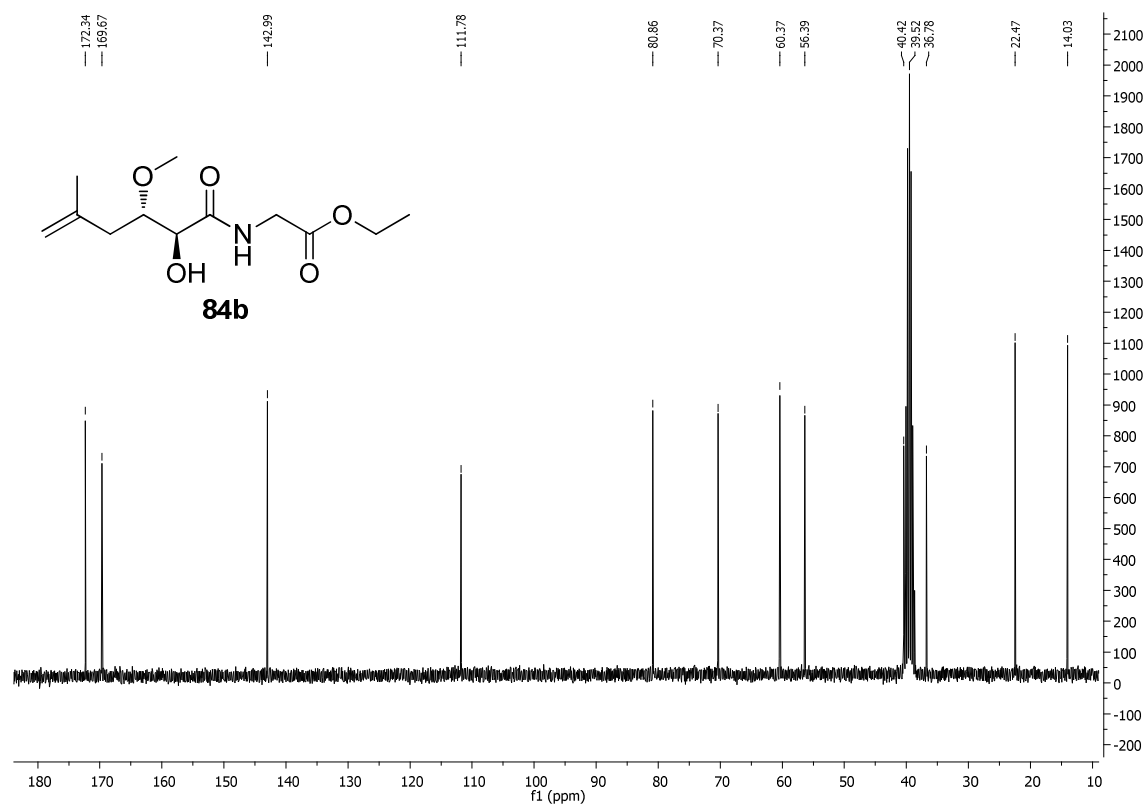


Abbildung 178: ^{13}C -NMR Spektrum (DMSO- d_6 , 100 MHz) von Ethyl-2-((2S,3S)-2-hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-enamido)acetat (84b).

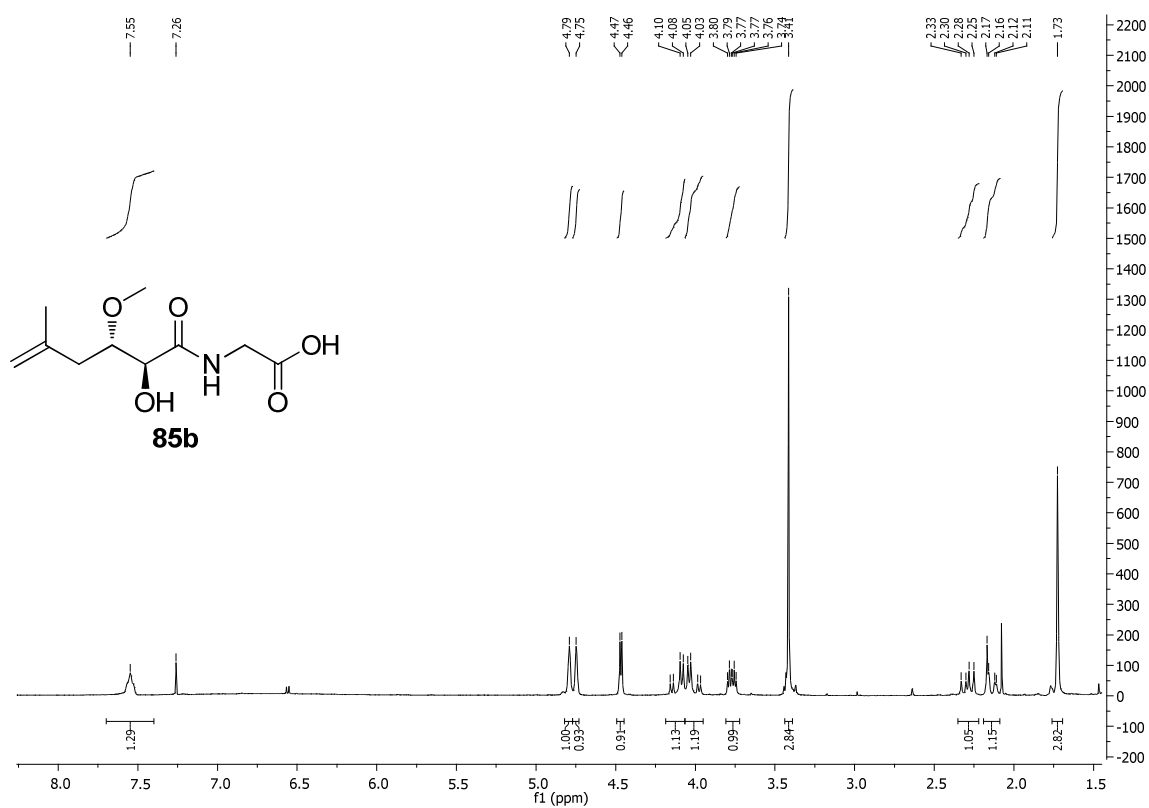


Abbildung 179: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz) von 2-((2S,3S)-2-Hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-enamido)essigsäure (85b).

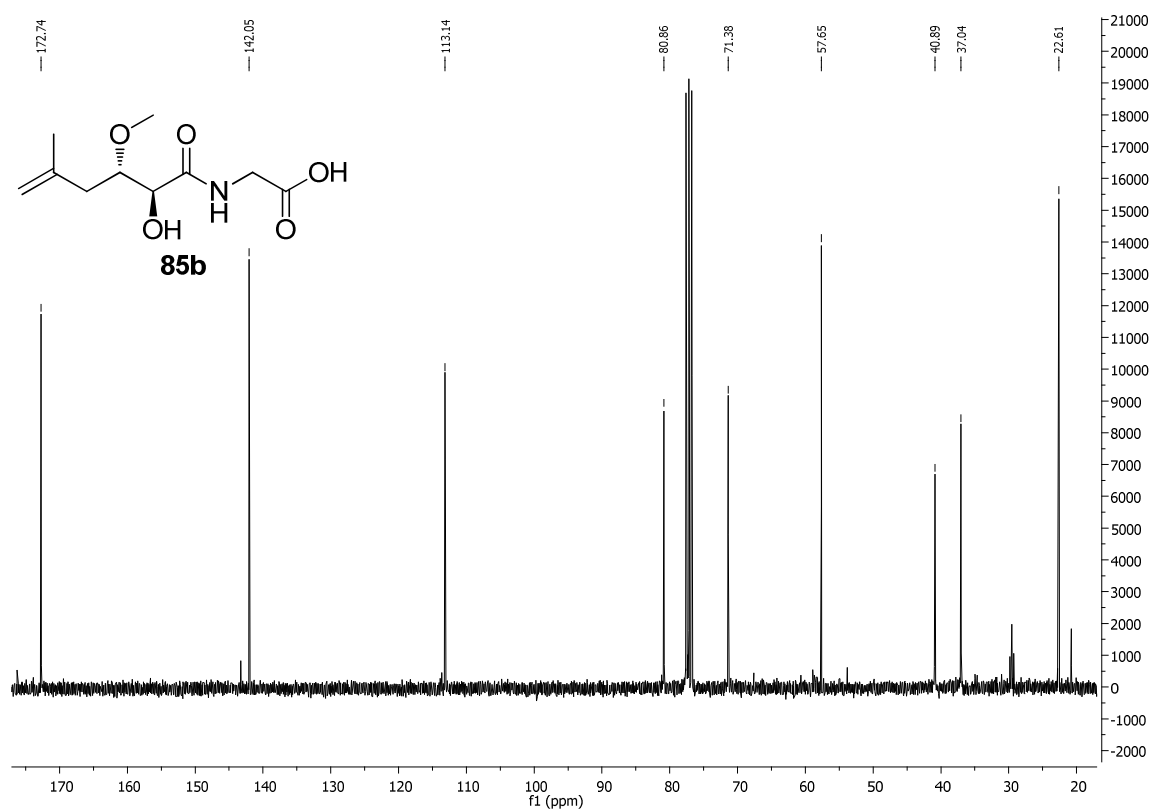


Abbildung 180: ¹³C-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von 2-((2*S*,3*S*)-2-Hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-enamido) essigsäure (**85b**).

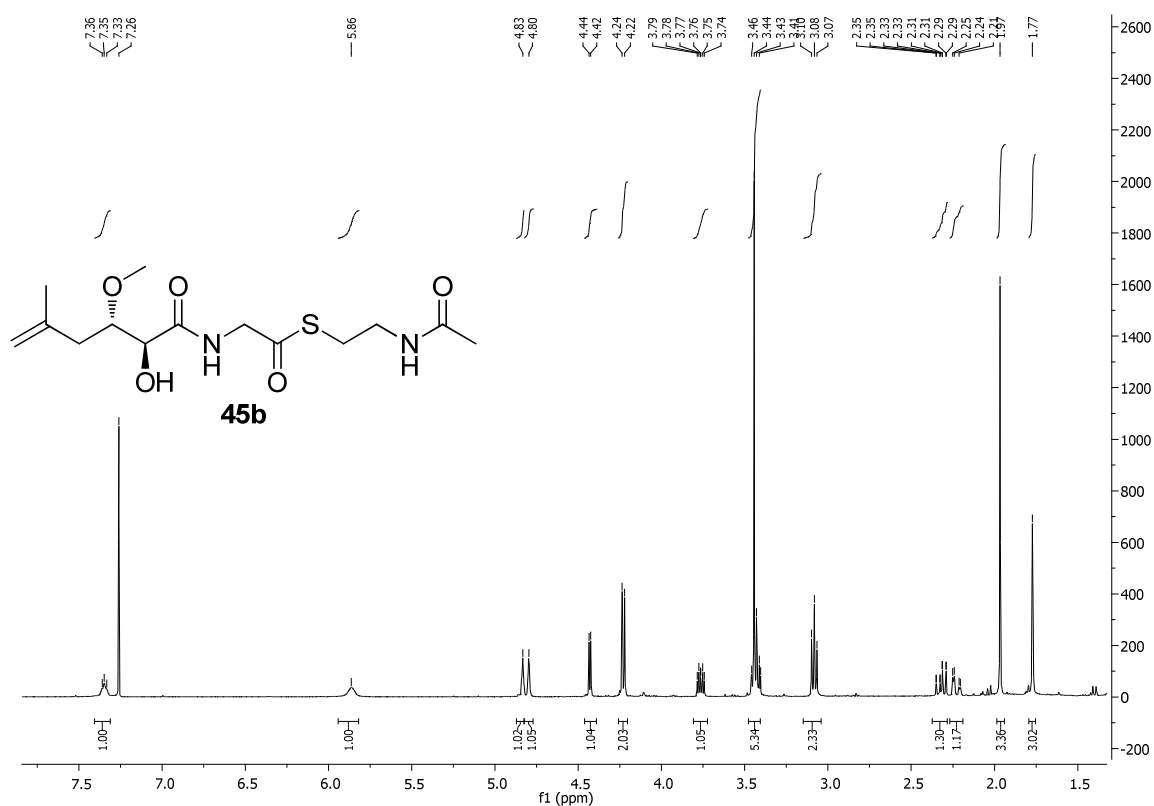


Abbildung 181: ¹H-NMR Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) von *S*-(2-Acetamidoethyl)-2-((2*S*,3*S*)-2-hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-enamido)ethanthioat (**45b**).

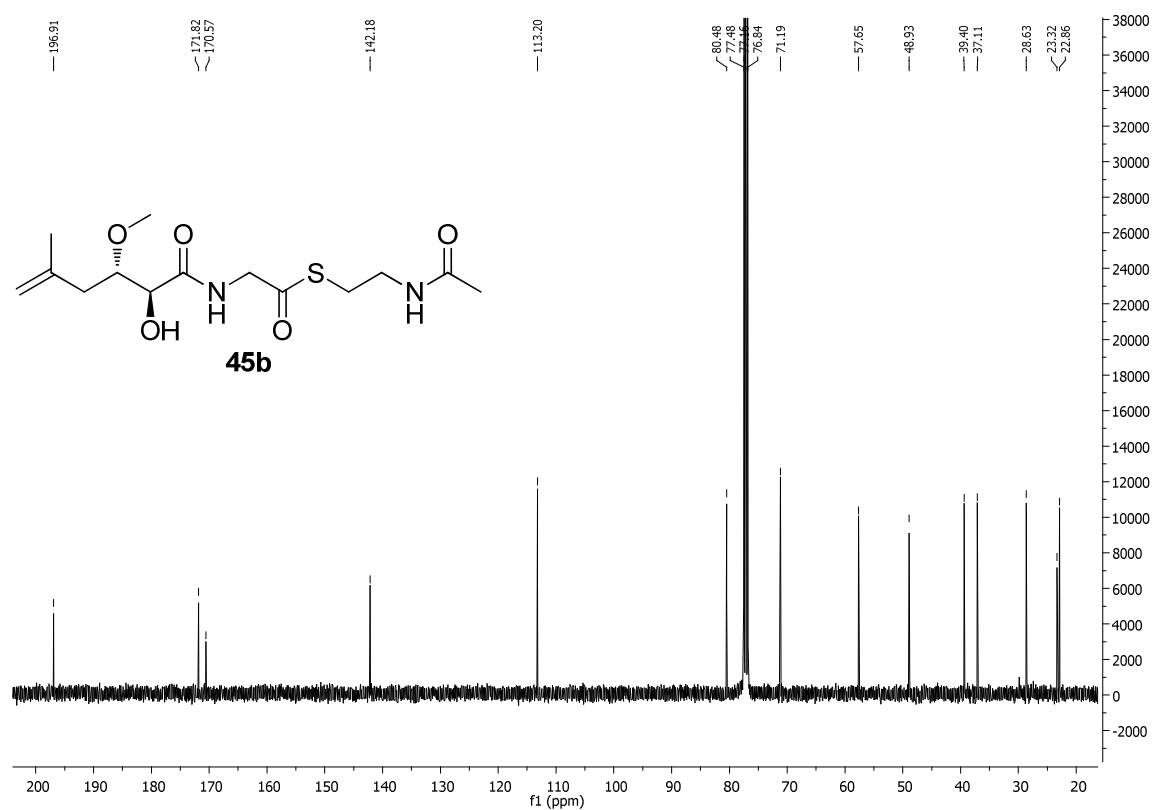


Abbildung 182: ^{13}C -NMR Spektrum (CDCl_3 , 100 MHz) von *S*-(2-Acetamidoethyl)-2-((2*S*,3*S*)-2-hydroxy-3-methoxy-5-methylhex-5-enamido)ethanthioat (45b).

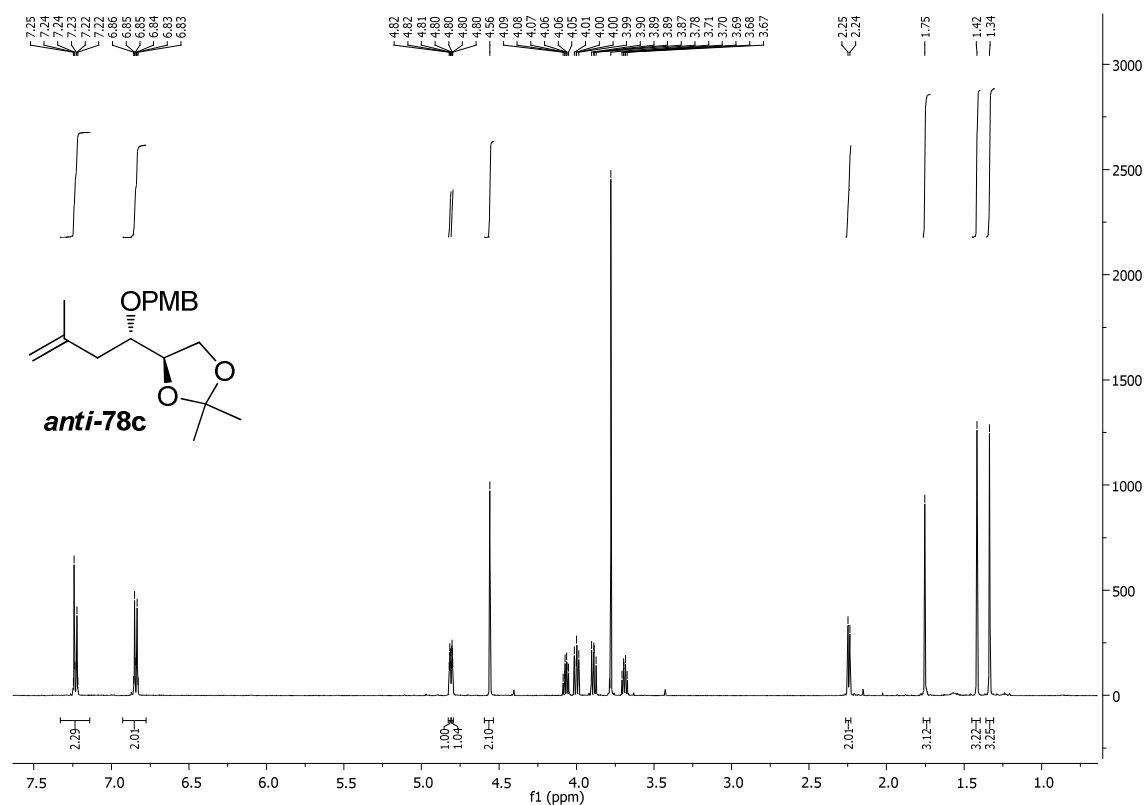


Abbildung 183: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz) von (*R*)-4-((*S*)-1-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylbut-3-en-1-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (*anti*-78c).

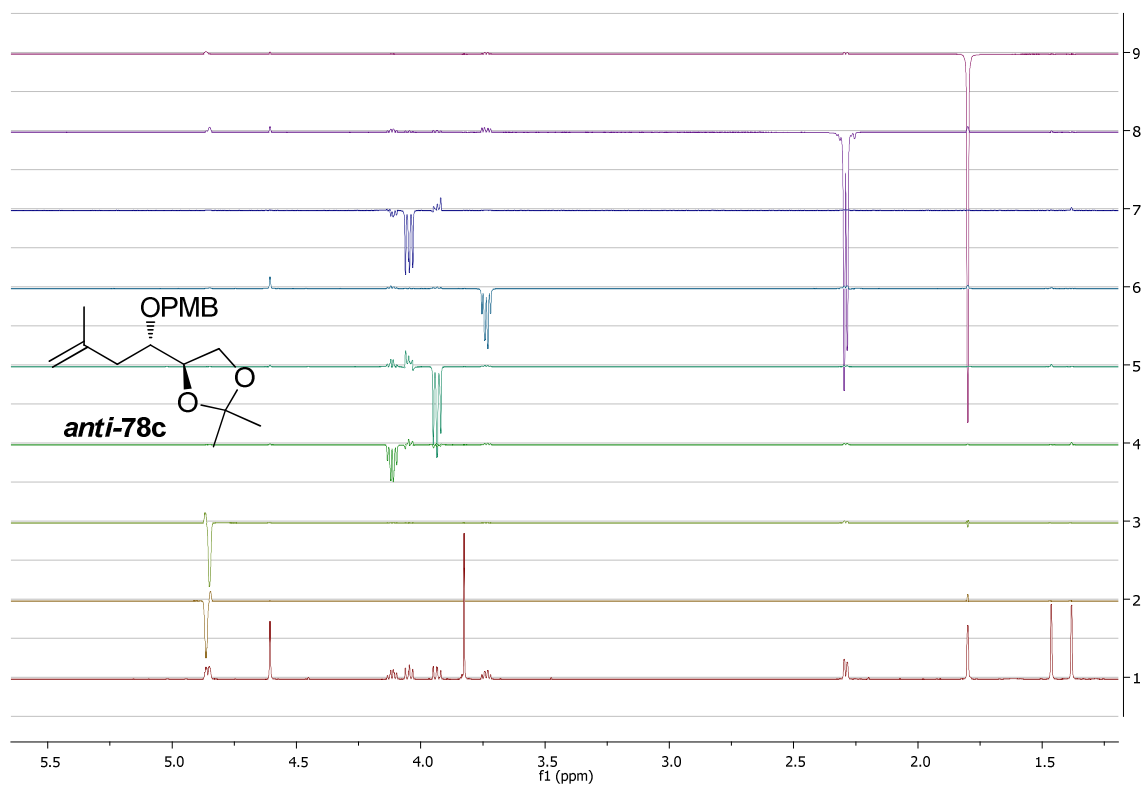


Abbildung 184: ¹H-NMR-*noe*-Spektrum (CDCl₃, 500 MHz) von *(R)*-4-((*S*)-1-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylbut-3-en-1-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (*anti*-78c).

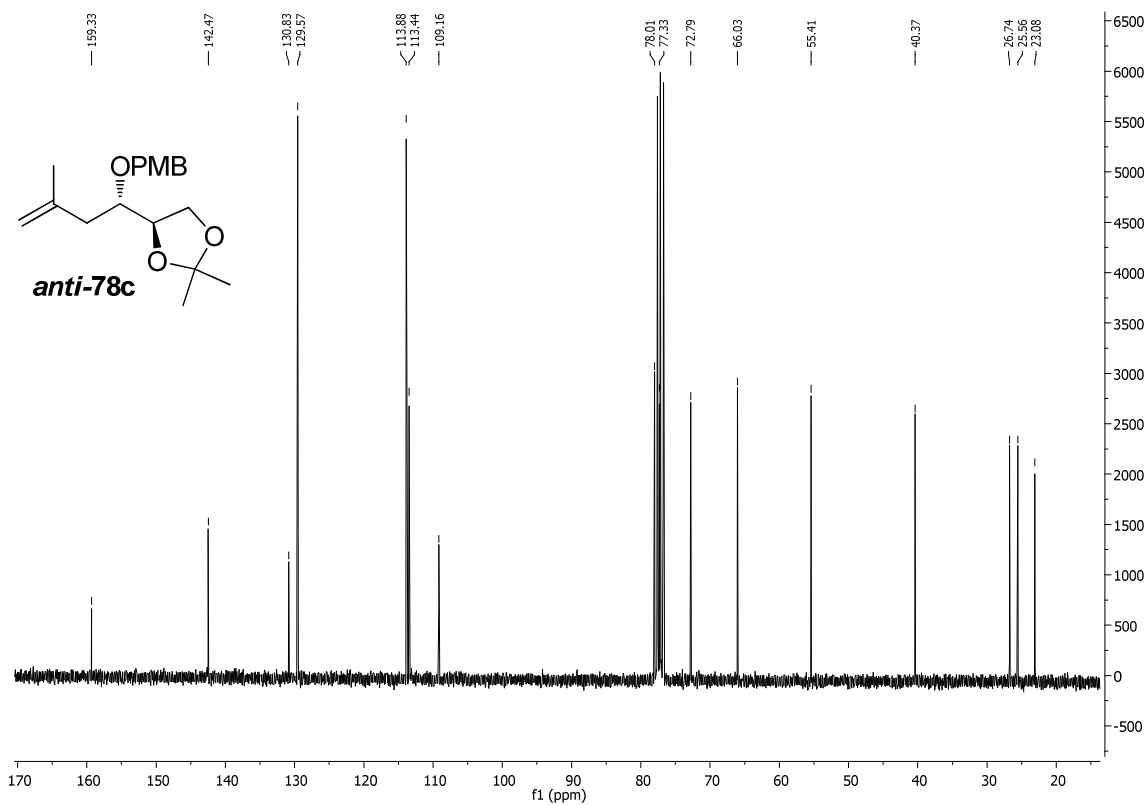


Abbildung 185: ¹³C-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von *(R)*-4-((*S*)-1-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylbut-3-en-1-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (*anti*-78c).

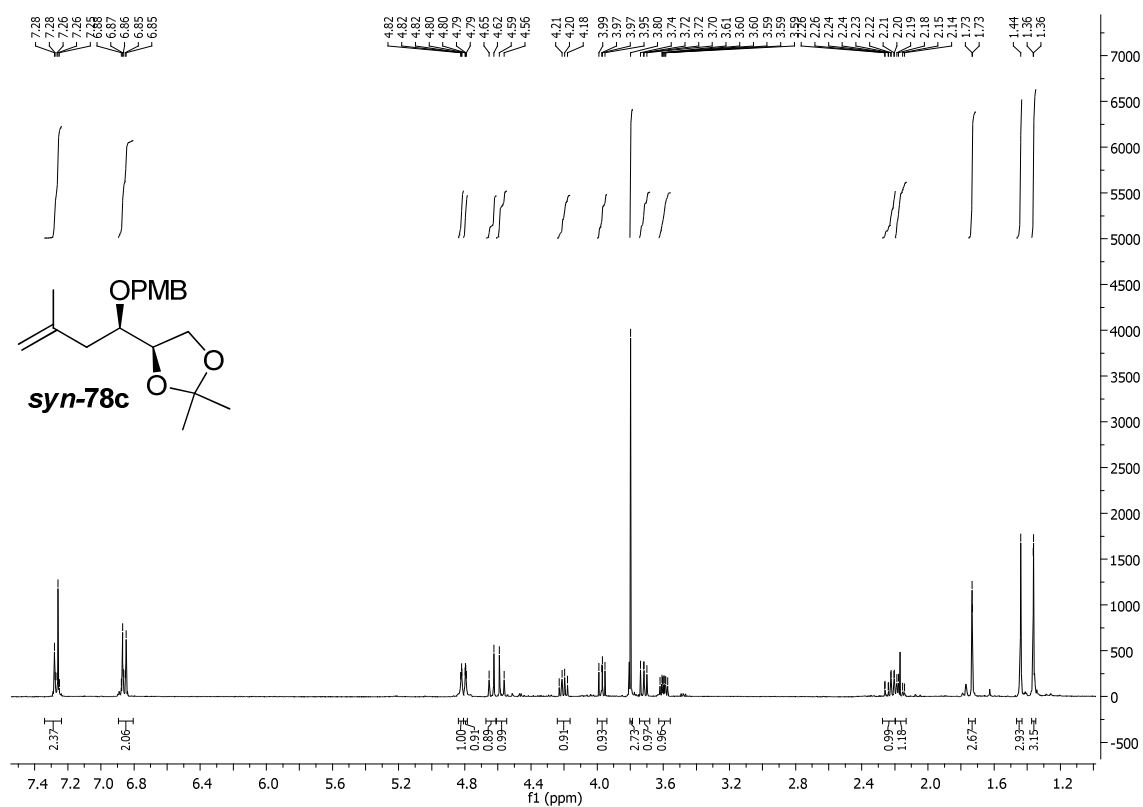


Abbildung 186: ¹H-NMR Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) von (*R*)-4-((*R*)-1-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylbut-3-en-1-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (*syn-78c*).

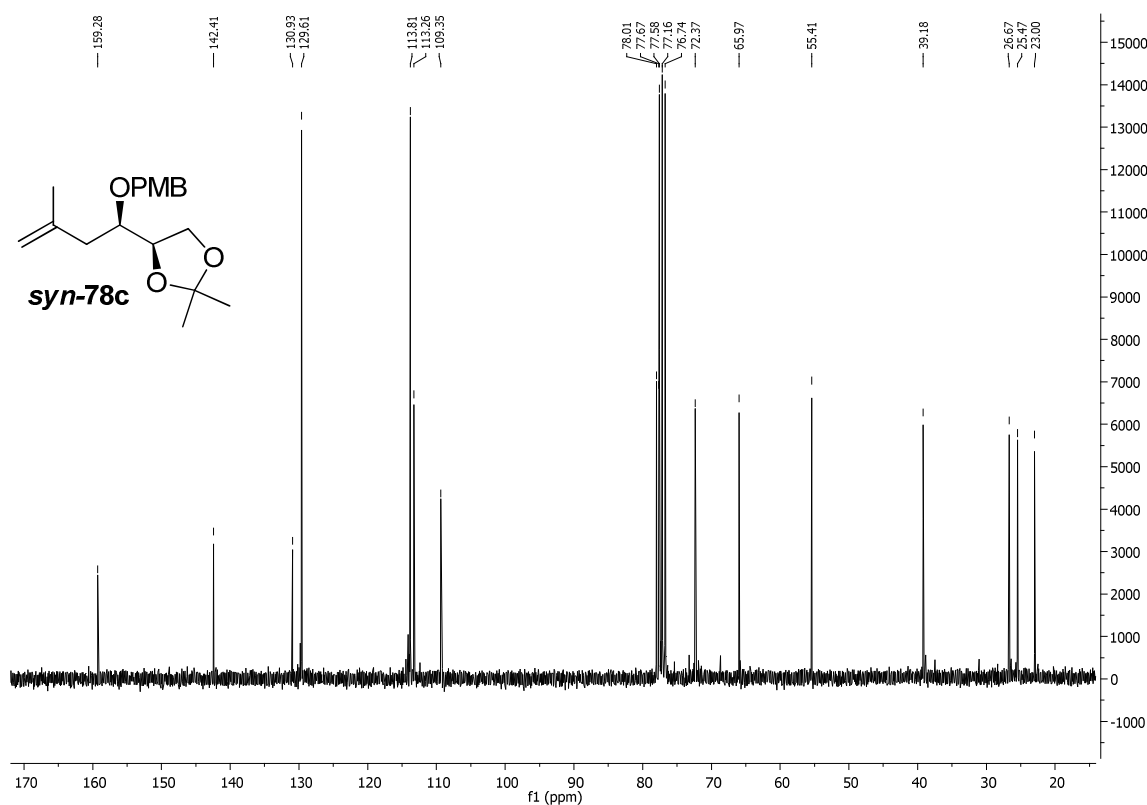


Abbildung 187: ¹³C-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von (*R*)-4-((*R*)-1-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylbut-3-en-1-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (*syn-78c*).

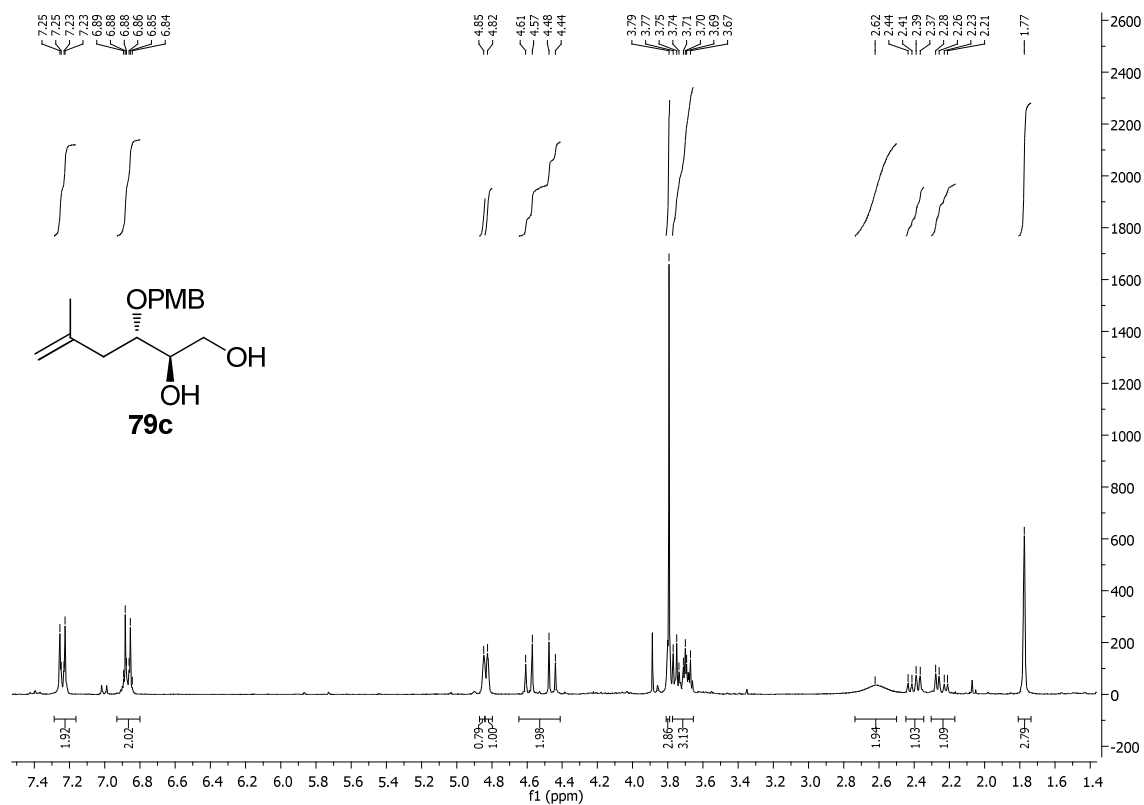


Abbildung 188: ¹H-NMR Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) von *(R)*-4-((*S*)-1-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylbut-3-en-1,2-diol (**79c**).

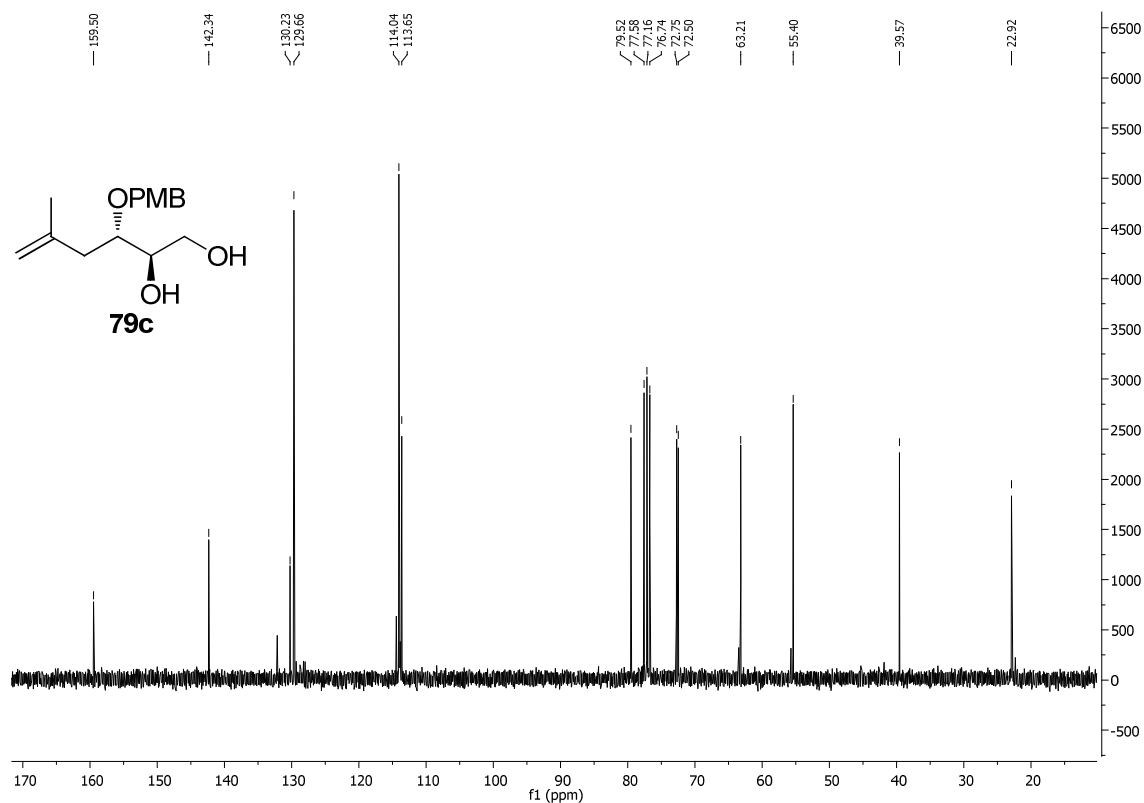
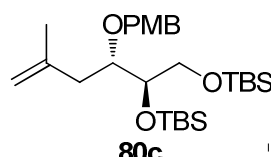
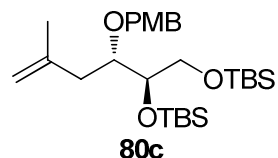


Abbildung 189: ¹³C-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von *(R)*-4-((*S*)-1-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylbut-3-en-1,2-diol (**79c**).



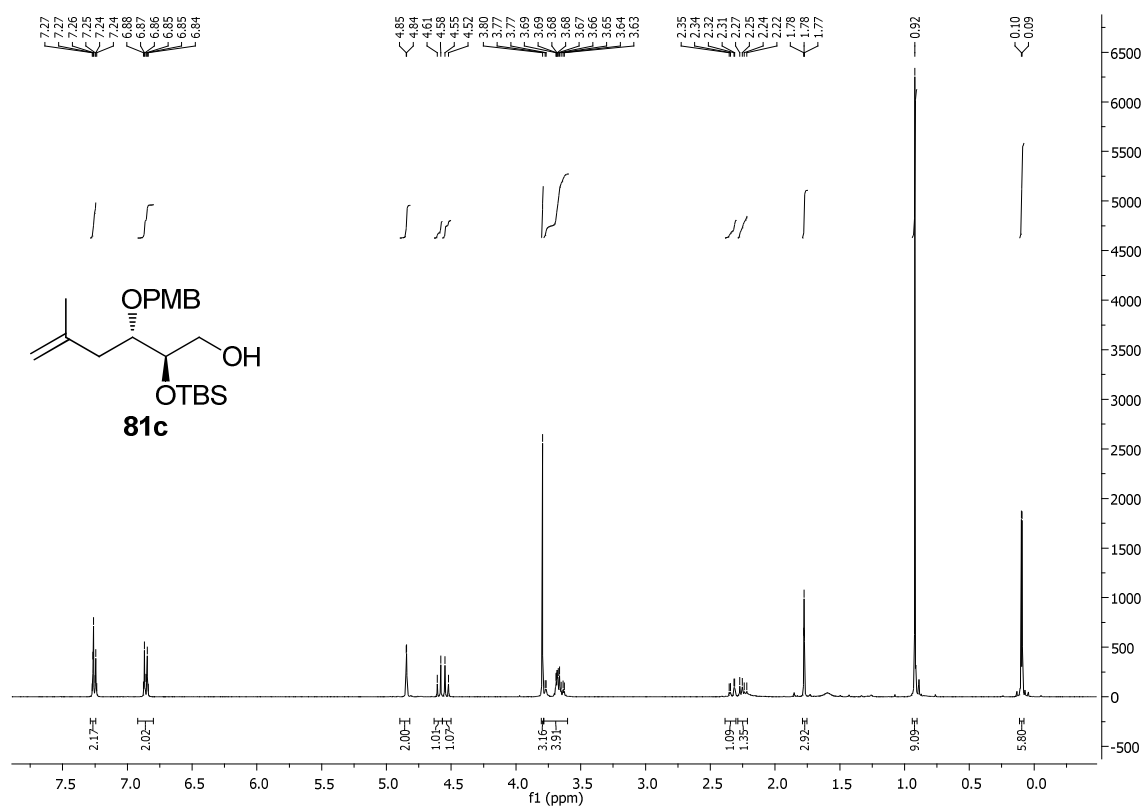


Abbildung 192: ¹H-NMR Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) von (2*R*,3*S*)-2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-3-(4-methoxybenzyl-oxy)-5-methylhex-5-en-1-ol (**81c**).

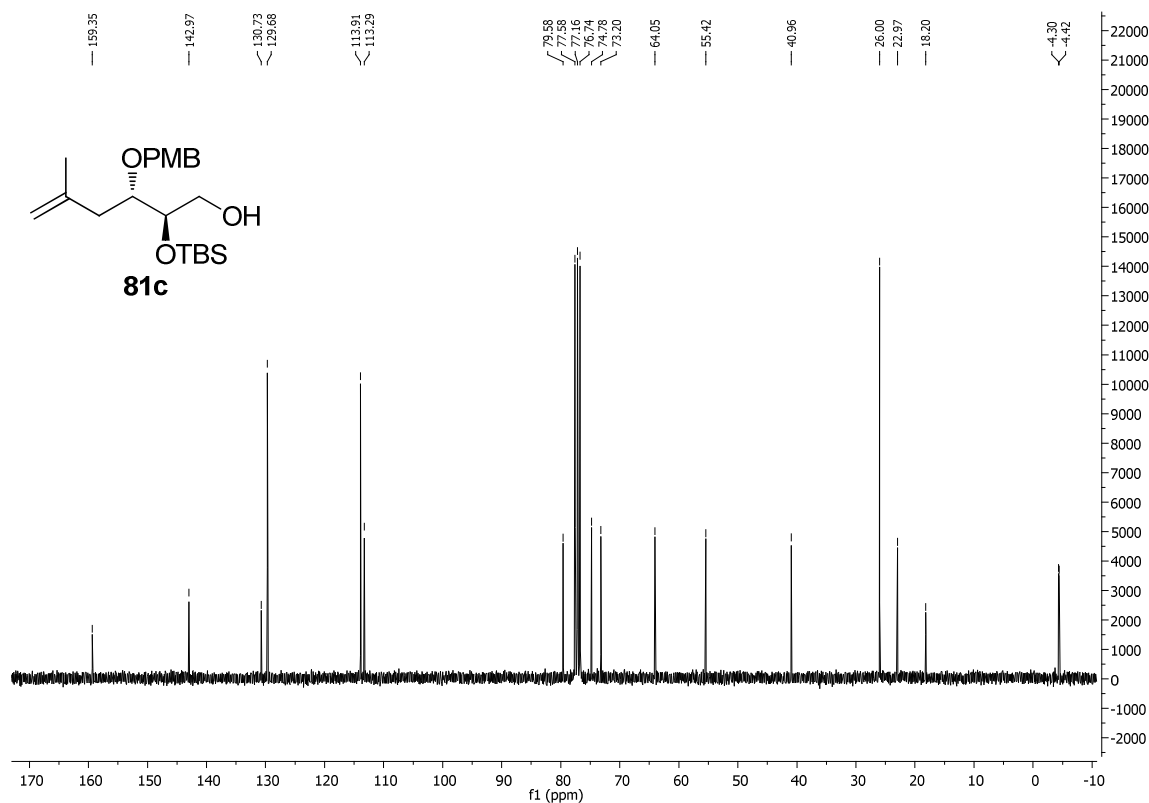


Abbildung 193: ¹³C-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von (2*R*,3*S*)-2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-3-(4-methoxybenzyl-oxy)-5-methylhex-5-en-1-ol (**81c**).

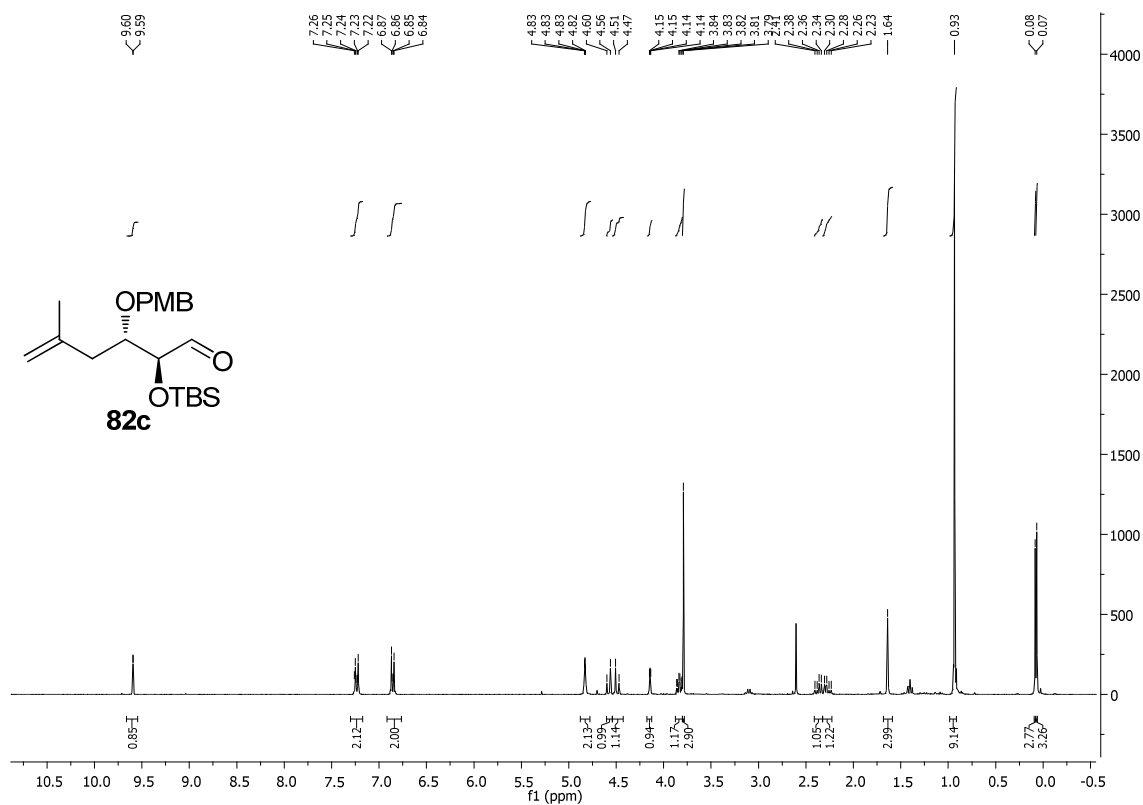


Abbildung 194: ¹H-NMR Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) von (2*R*,3*S*)-2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-3-(4-methoxybenzyl-oxy)-5-methylhex-5-enal (**82c**).

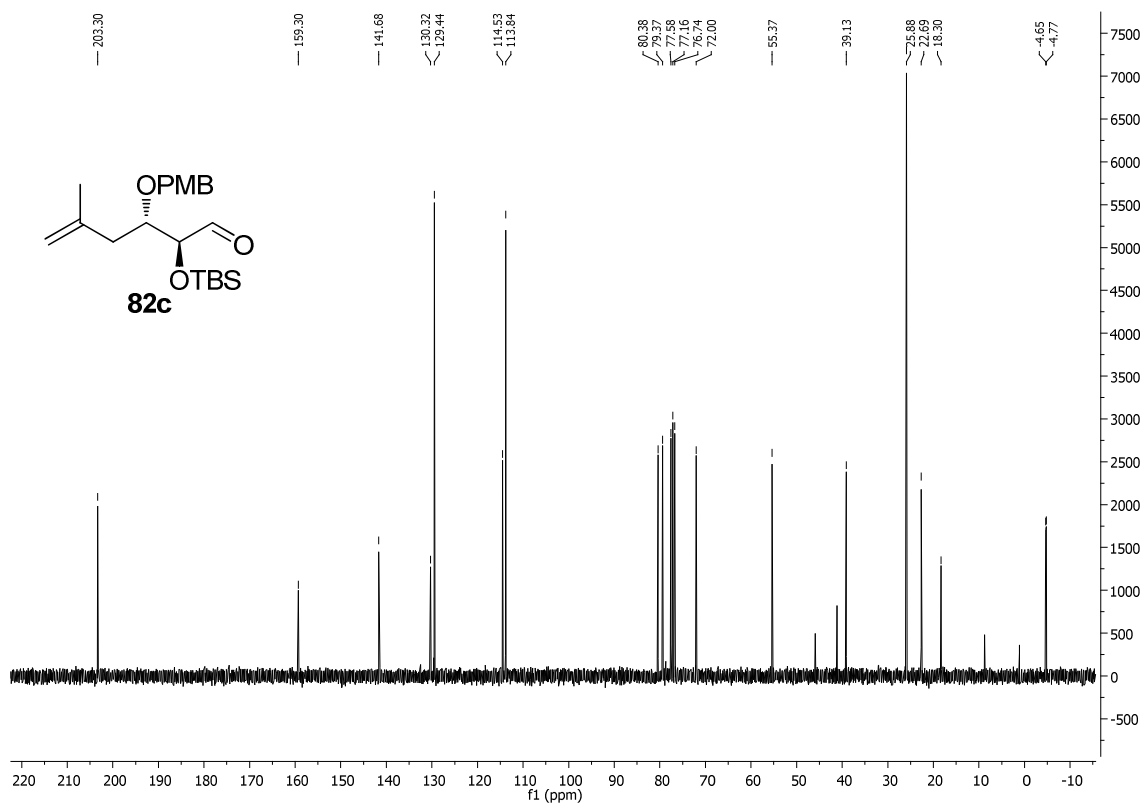


Abbildung 195: ¹³C-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von (2*R*,3*S*)-2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-3-(4-methoxybenzyl-oxy)-5-methylhex-5-enal (**82c**).

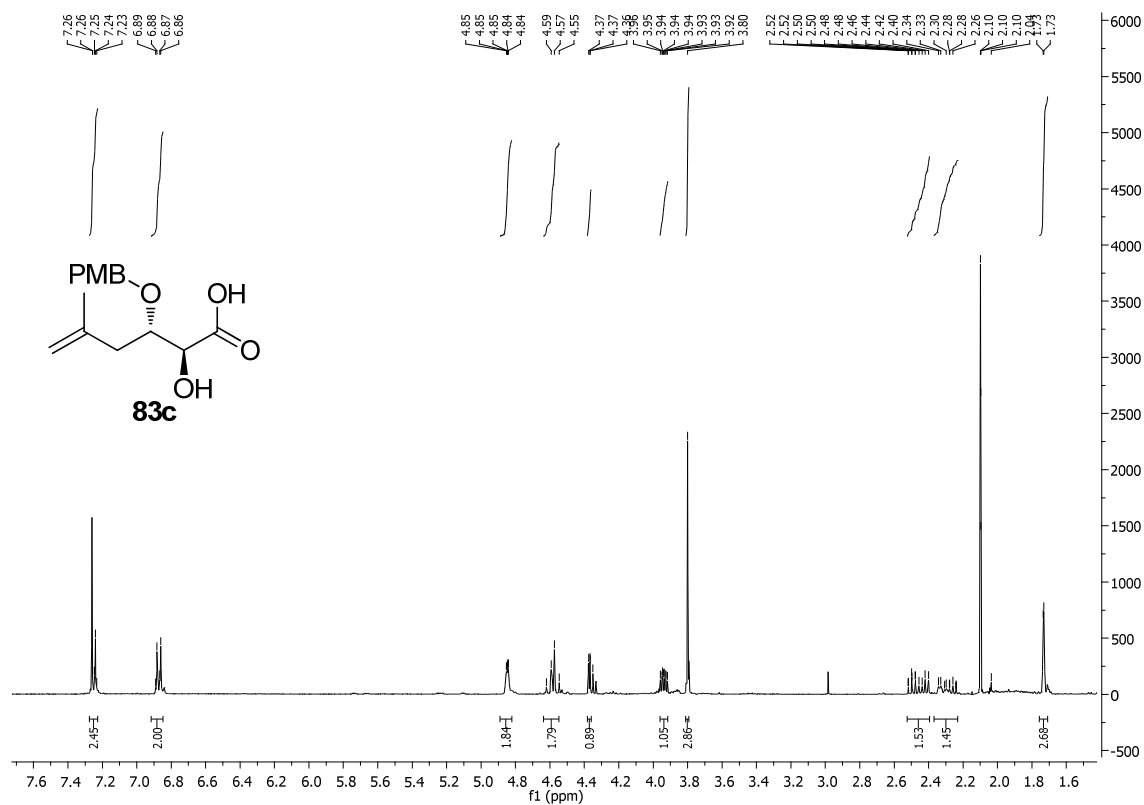


Abbildung 196: ¹H-NMR Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) von (2*R*,3*S*)-2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-3-(4-methoxybenzyl-oxy)-5-ensäure (**83c**).

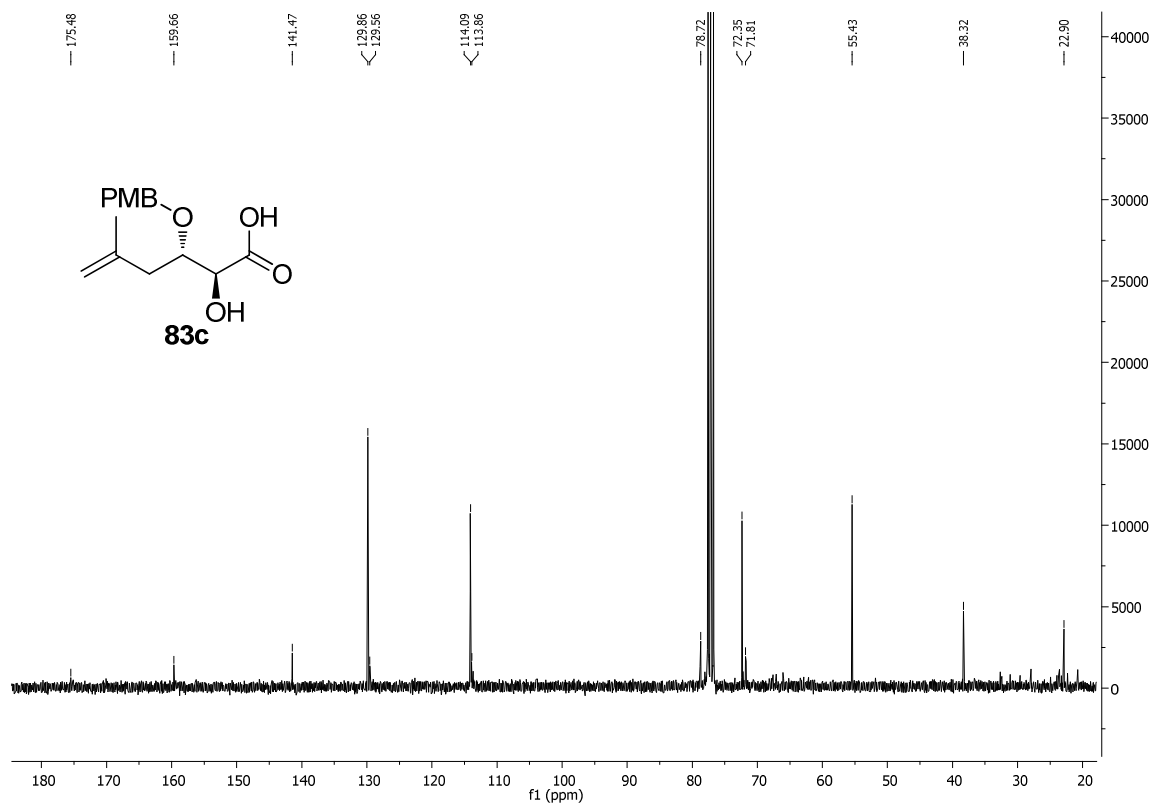


Abbildung 197: ¹³C-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von (2*R*,3*S*)-2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-3-(4-methoxybenzyl-oxy)-5-ensäure (**83c**).

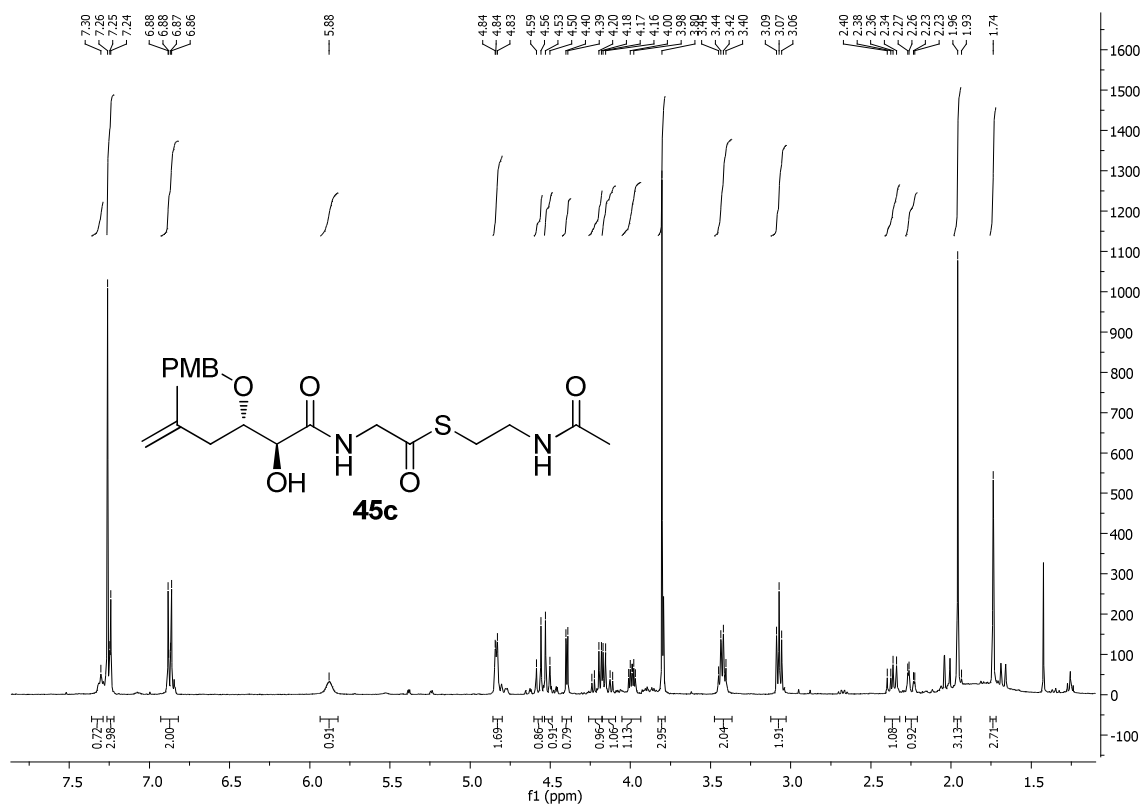


Abbildung 198: ¹H-NMR Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) von *S*-(2-Acetamidoethyl)-2-((2*S*,3*S*)-2-hydroxy-3-(4-methoxybenzyloxy)-5-methylhex-5-enamido)ethanthioat (**45c**).

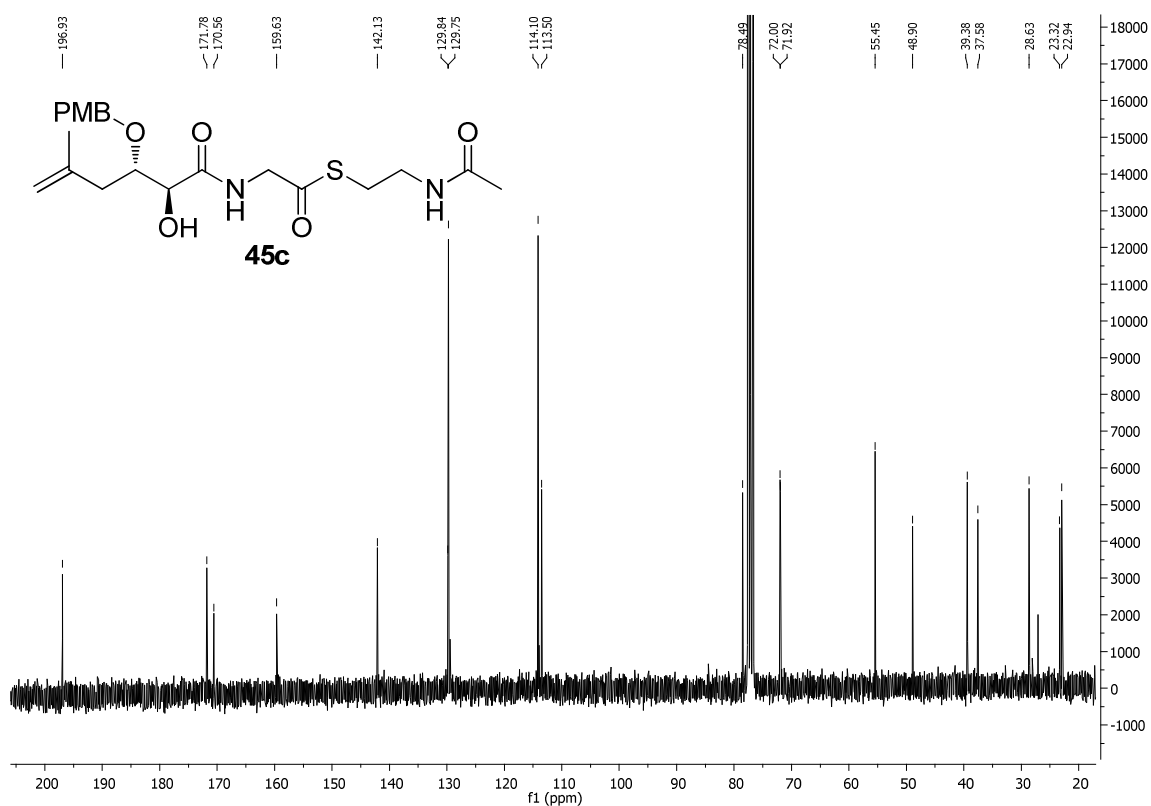


Abbildung 199: ¹³C-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von *S*-(2-Acetamidoethyl)-2-((2*S*,3*S*)-2-hydroxy-3-(4-methoxybenzyloxy)-5-methylhex-5-enamido)ethanthioat (**45c**).

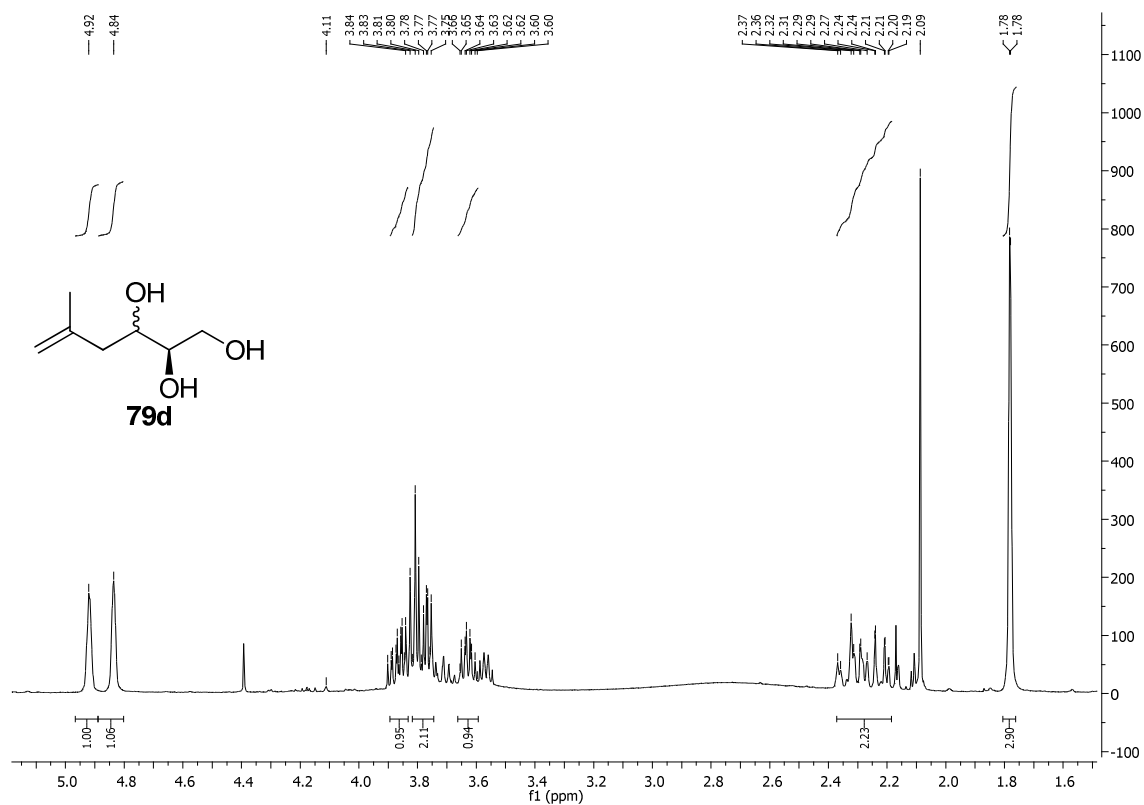


Abbildung 200: ¹H-NMR Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) von (2*R*)-5-Methylhex-5-en-1,2,3-triol (**79d**).

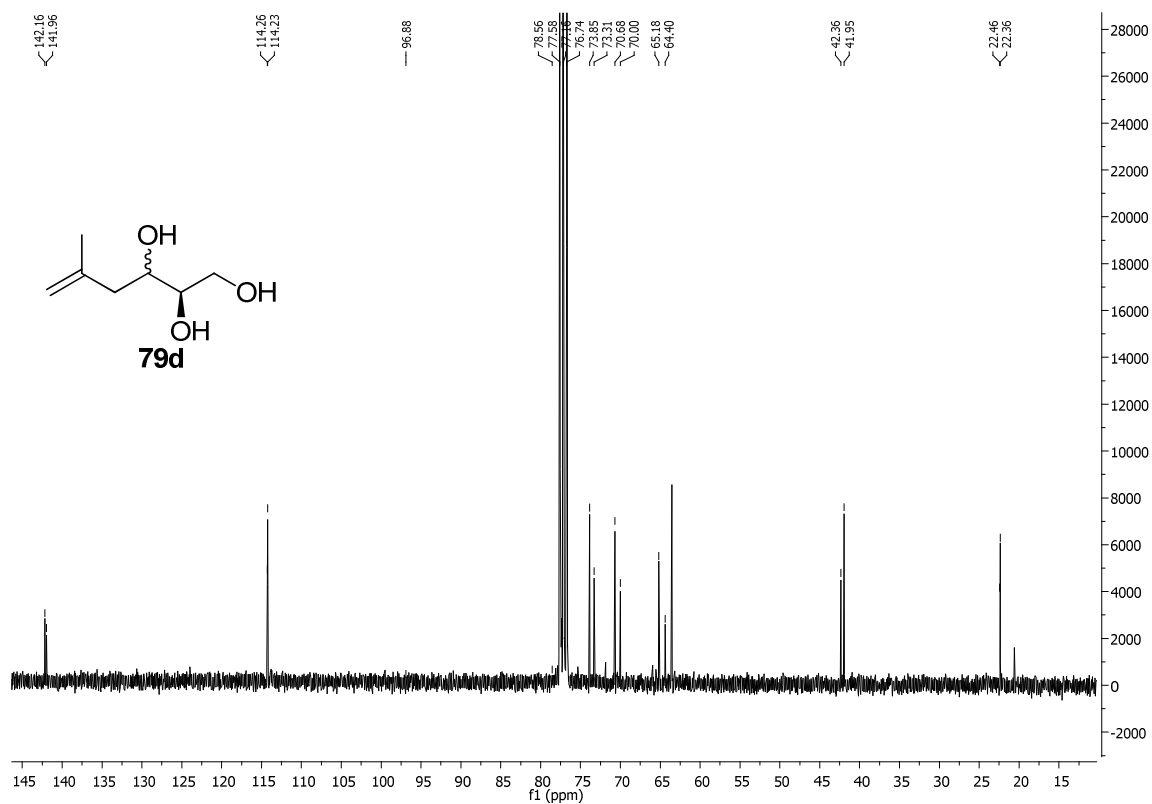
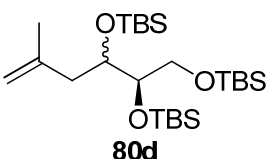
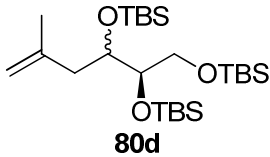


Abbildung 201: ¹³C-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von (2*R*)-5-Methylhex-5-en-1,2,3-triol (**79d**).



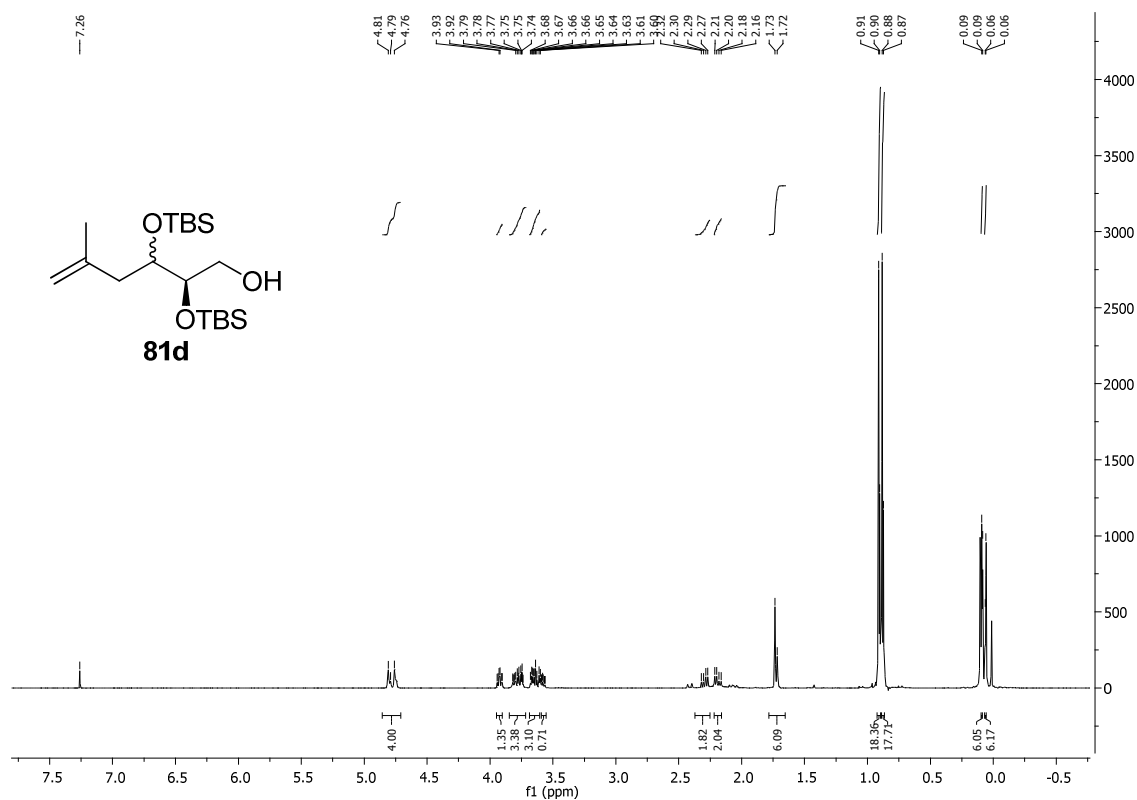


Abbildung 204: ¹H-NMR Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) von (2*R*)-2,3-Di-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-3-5-methylhex-5-en-1-ol (**81d**).

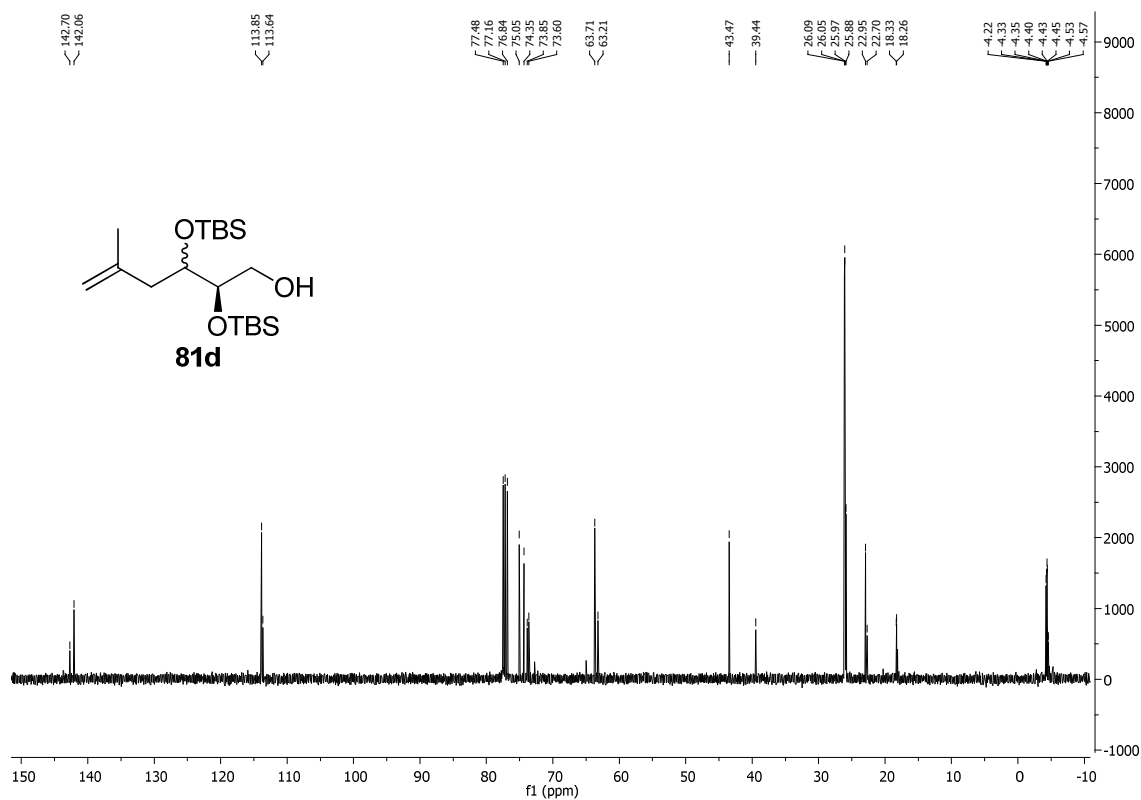


Abbildung 205: ¹³C-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von (2*R*)-2,3-Di-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-3-5-methylhex-5-en-1-ol (**81d**).

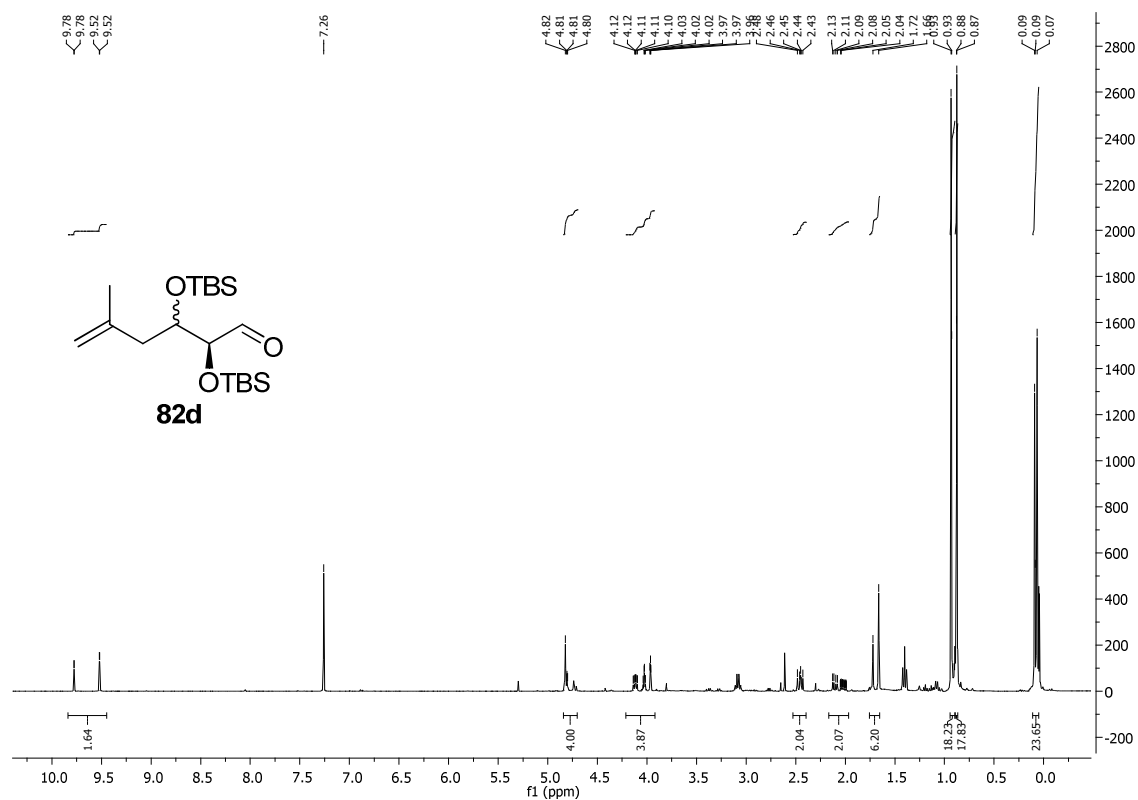


Abbildung 206: ¹H-NMR Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) von (2*S*)-2,3-Bis-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-5-methylhex-5-enal (**82d**).

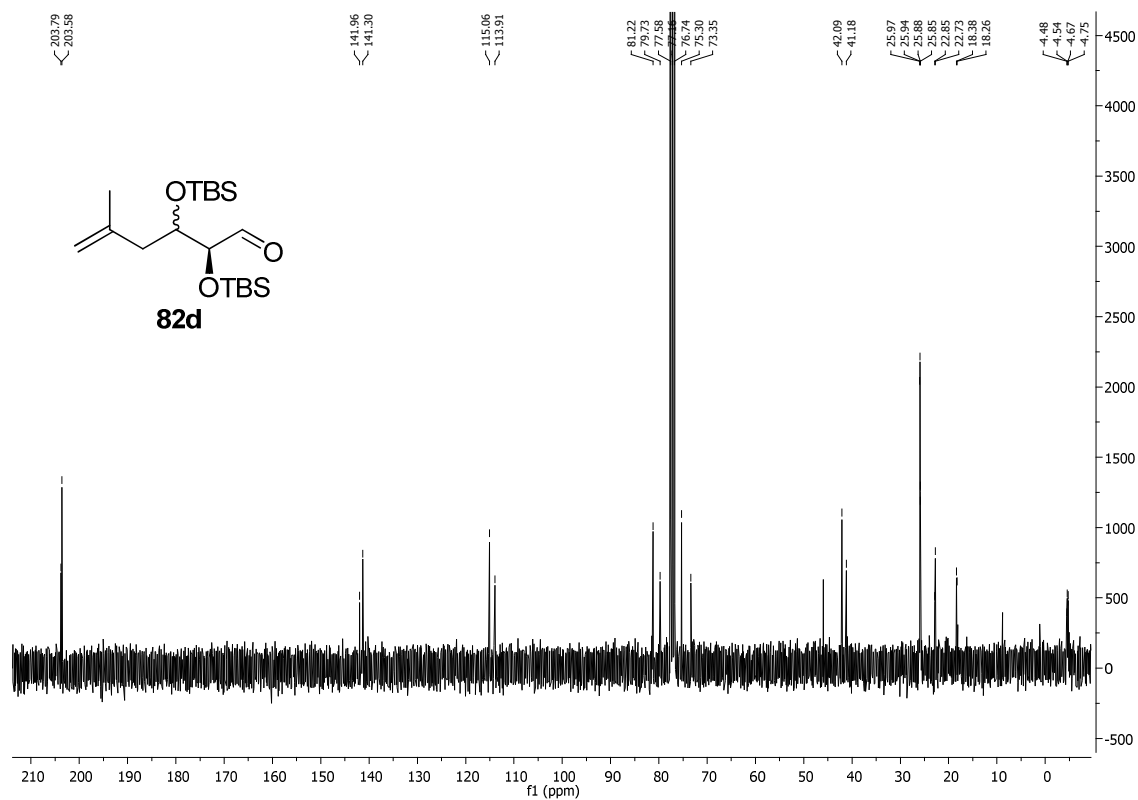


Abbildung 207: ¹³C-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von (2*S*)-2,3-Bis-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-5-methylhex-5-enal (**82d**).

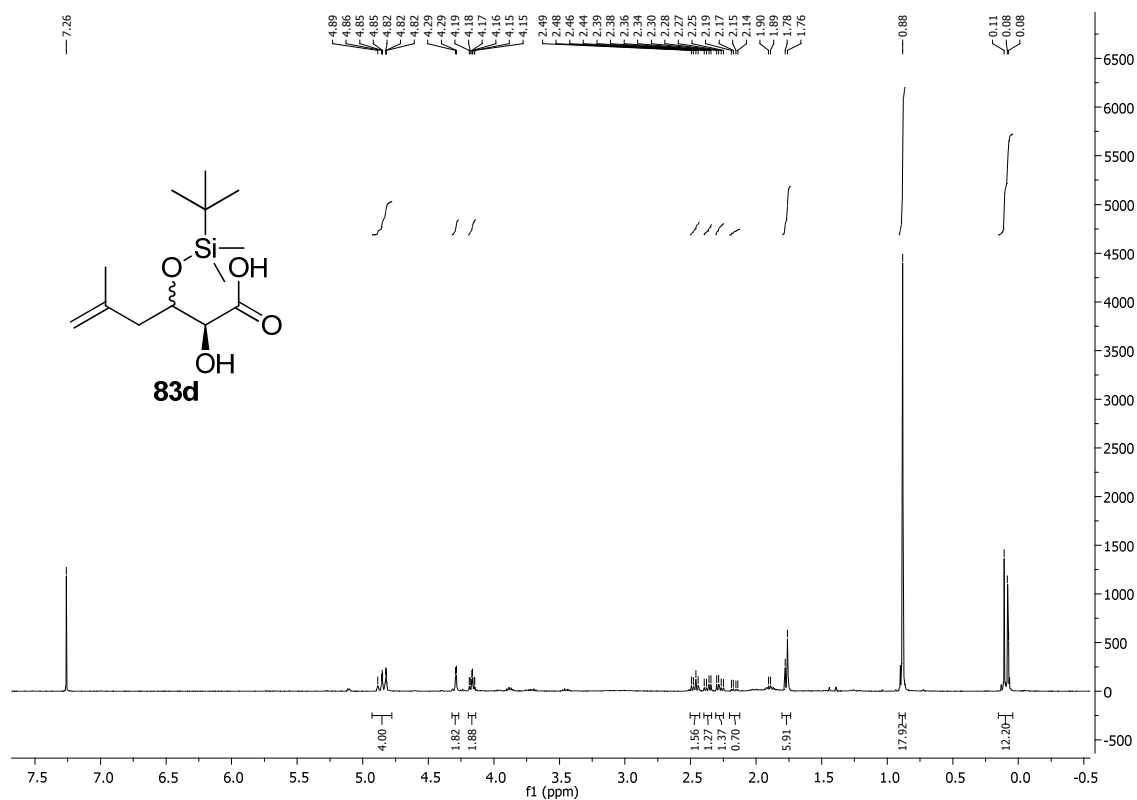


Abbildung 208: ¹H-NMR Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) von (2*S*)-2,3-Bis-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-5-methylhex-5-enol (83d).

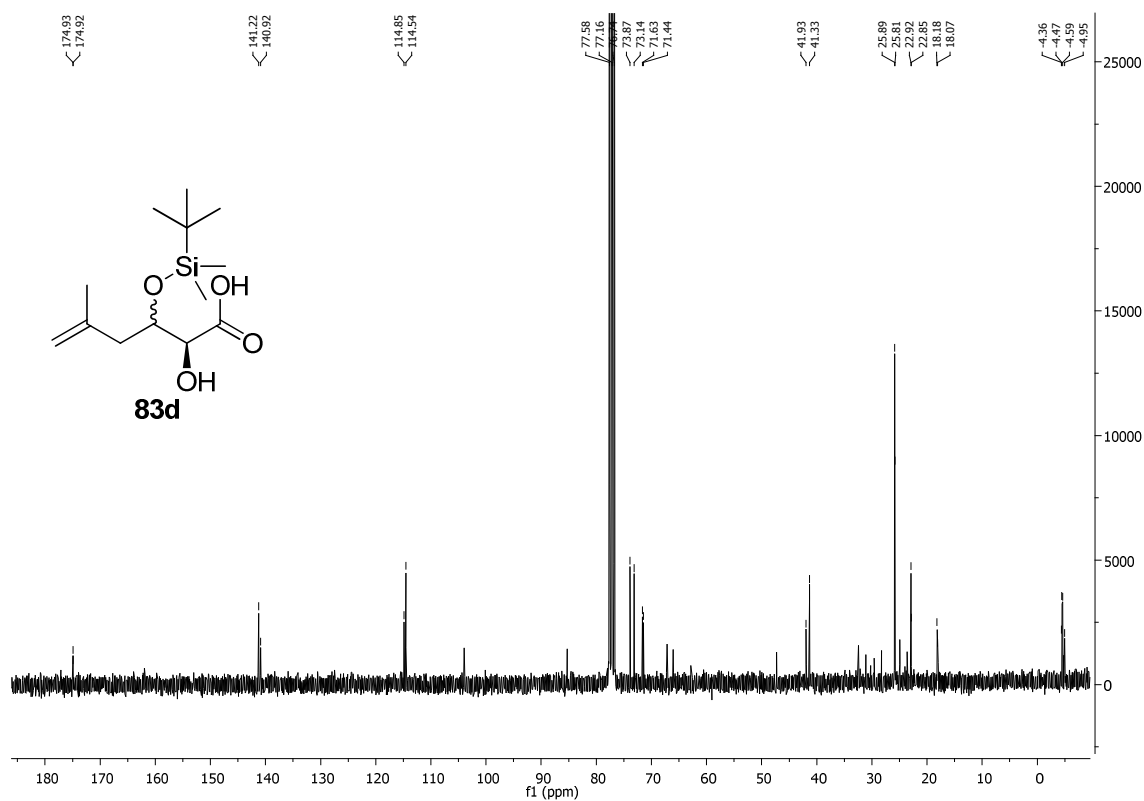


Abbildung 209: ¹³C-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von (2*S*)-2,3-Bis-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-5-methylhex-5-enol (83d).

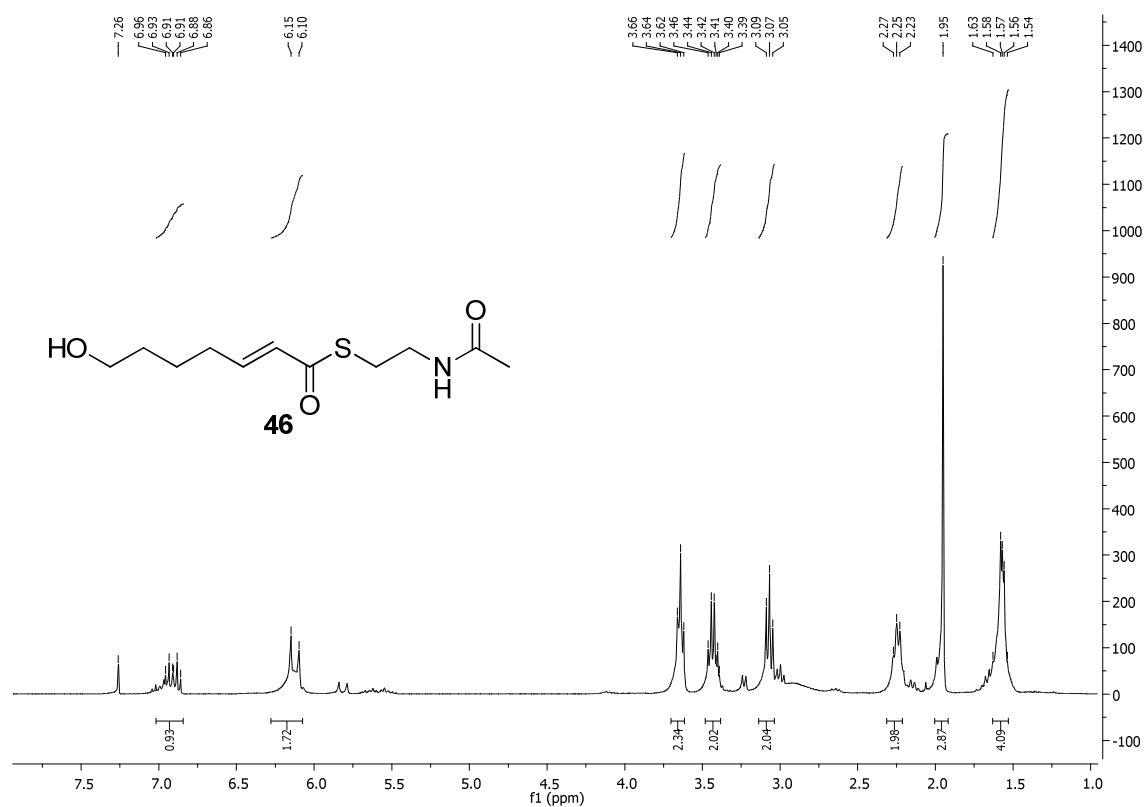


Abbildung 210: ¹H-NMR Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) von *E*-S-(2-Acetamidoethyl)-7-hydroxyhept-2-enthioat (**46**).

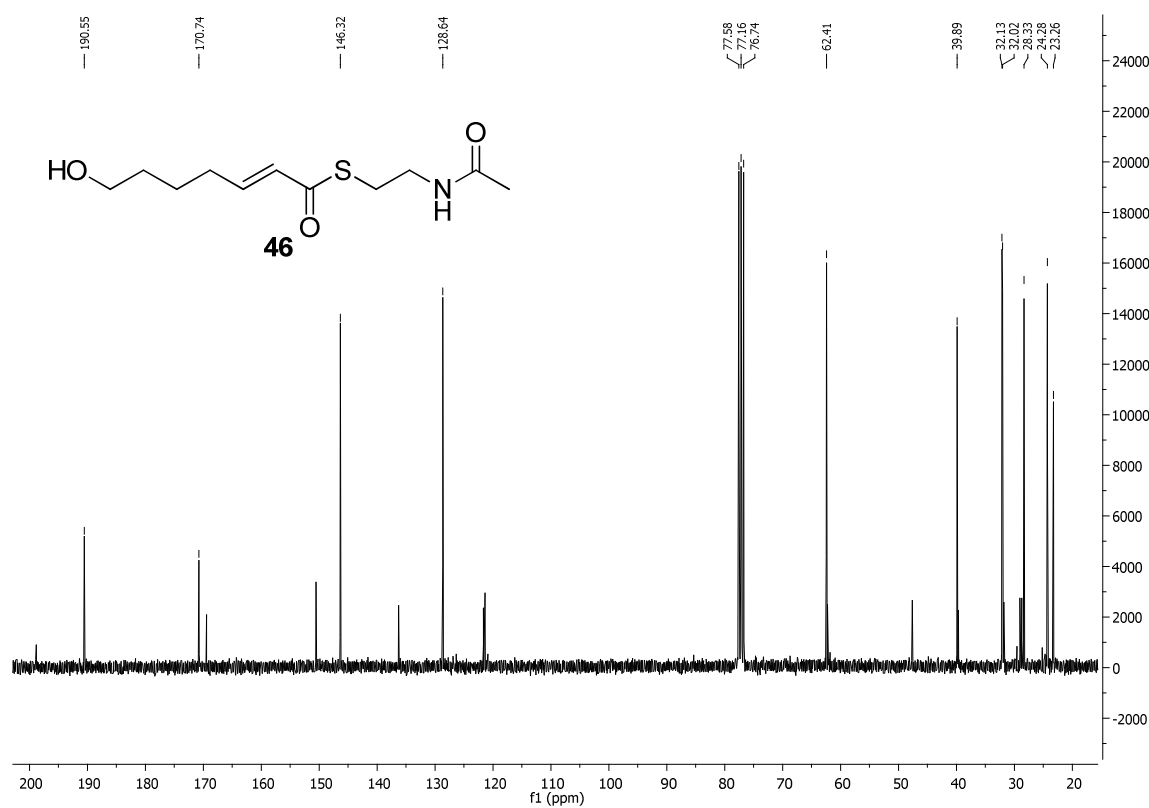


Abbildung 211: ¹³C-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von *E*-S-(2-Acetamidoethyl)-7-hydroxyhept-2-enthioat (**46**).

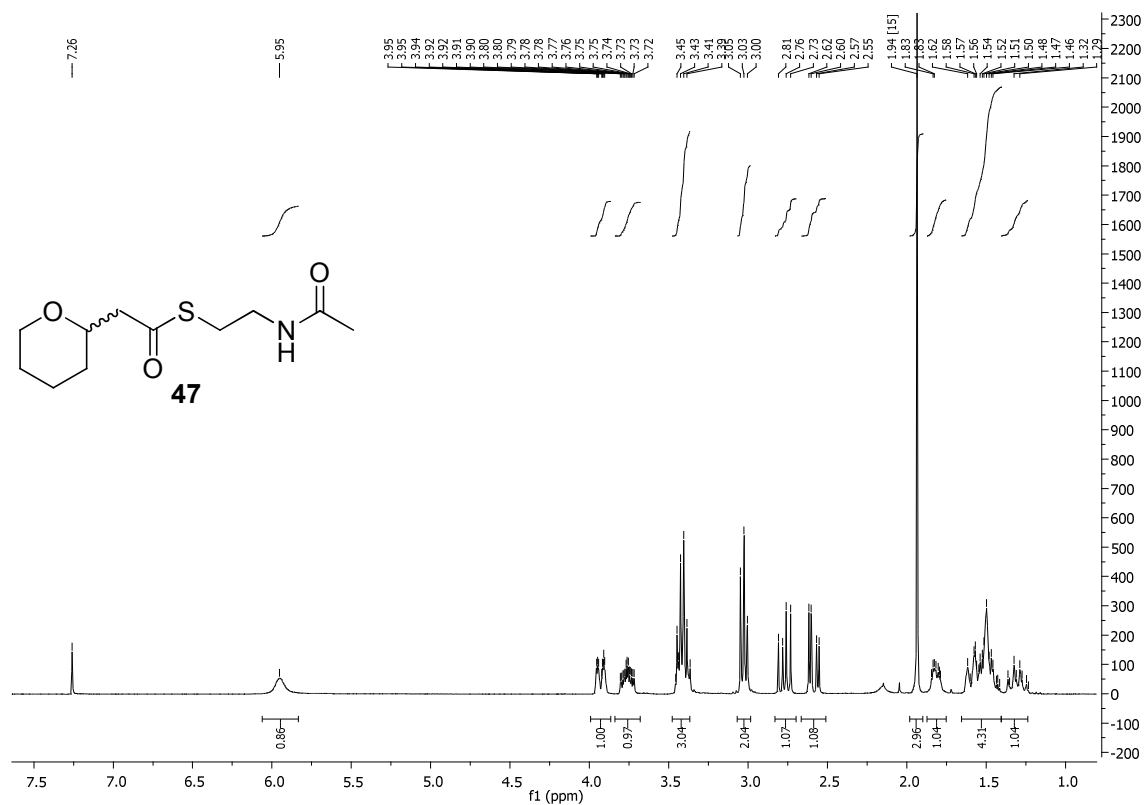


Abbildung 212: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz) von *S*-(2-Acetamidoethyl)-2-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)ethanthioat (**47**).

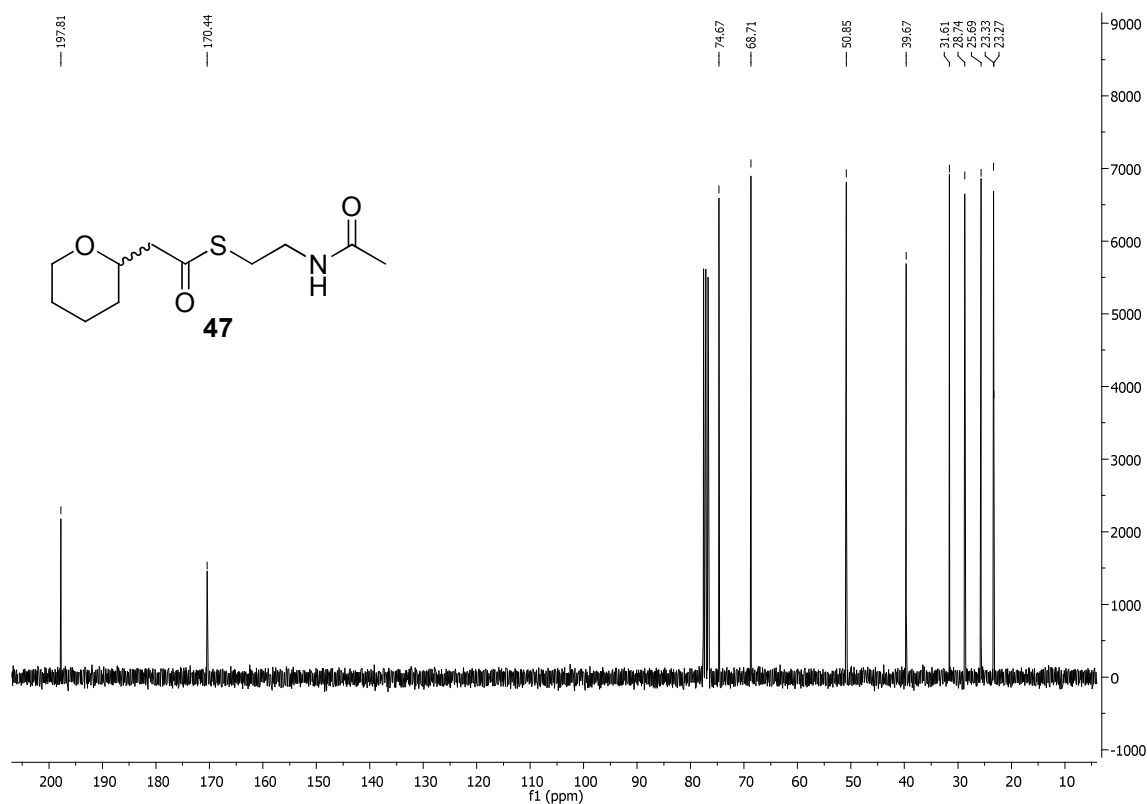


Abbildung 213: ^{13}C -NMR Spektrum (CDCl_3 , 100 MHz) von *S*-(2-Acetamidoethyl)-2-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)ethanthioat (**47**).

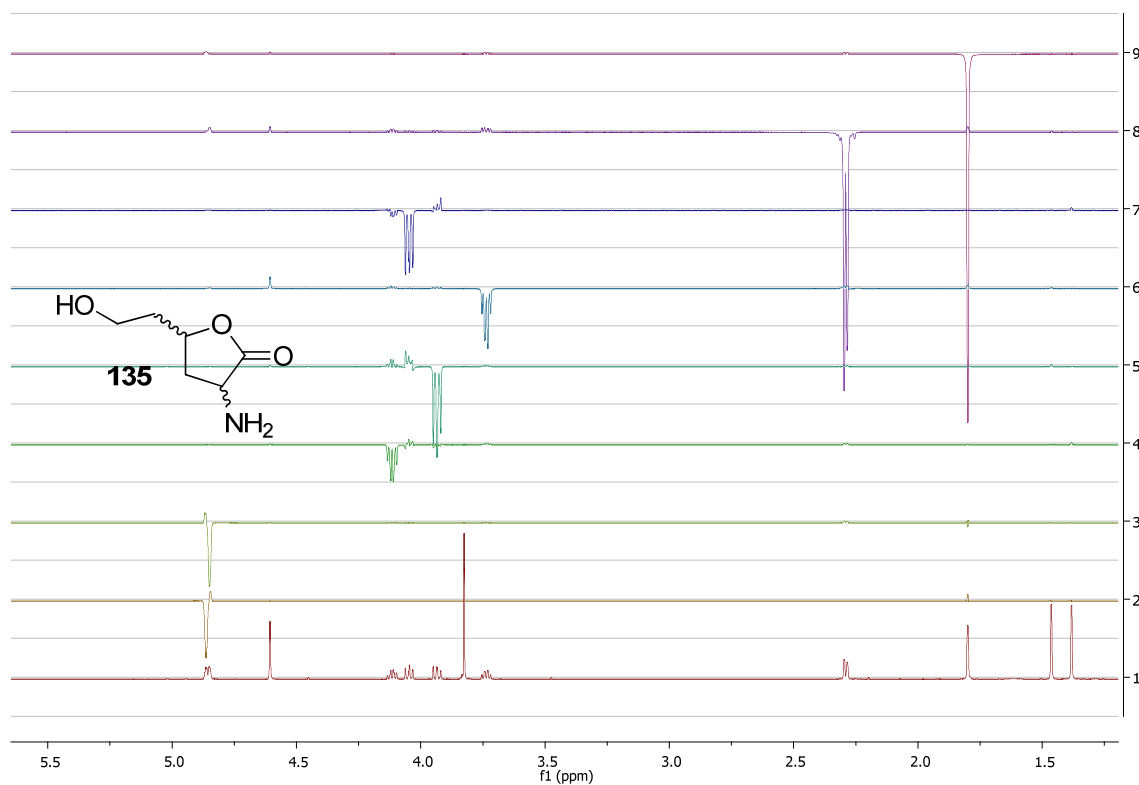


Abbildung 214: ^1H -*noe*-NMR Spektrum (D_2O , 500 MHz) von 3-Amino-5-(2-hydroxyethyl)dihydrofuran-2(3H)-on (132).

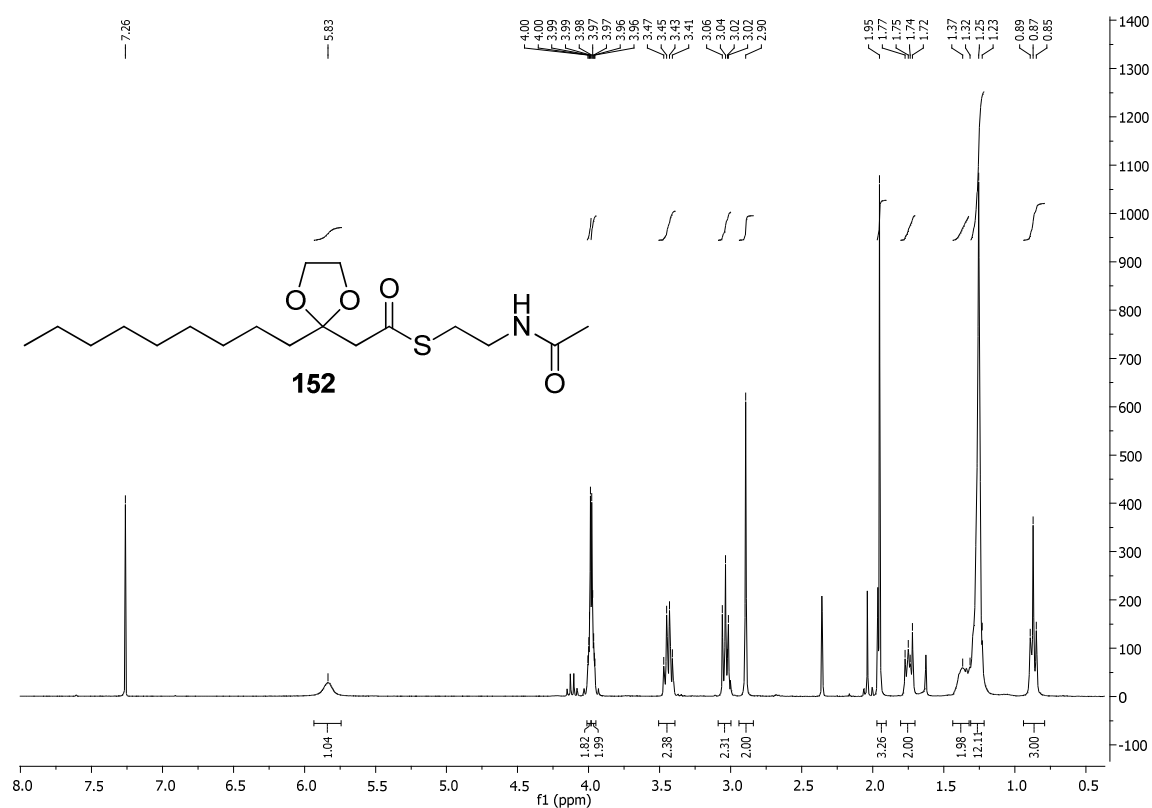


Abbildung 215: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz) von 2-(2-Nonyl-1,3-dioxolan-2-yl)essigsäure (148).

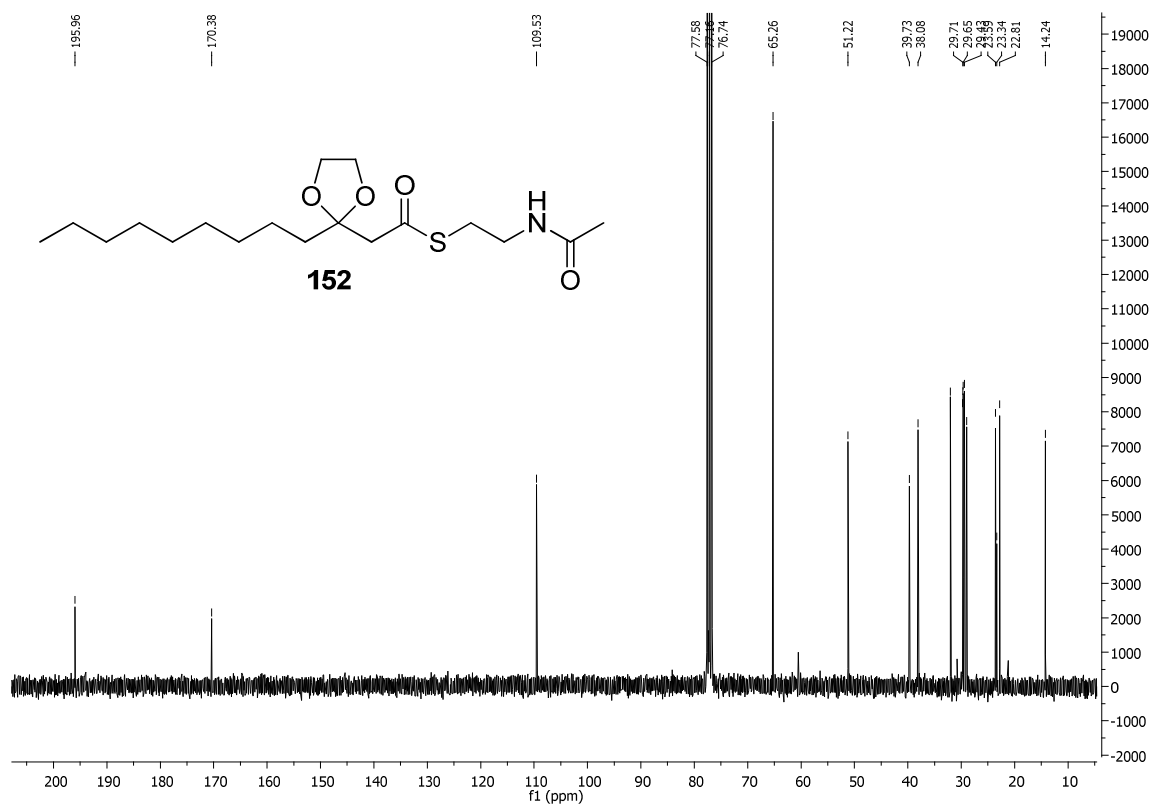


Abbildung 216: ^{13}C -NMR Spektrum (CDCl_3 , 100 MHz) von 2-(2-Nonyl-1,3-dioxolan-2-yl)essigsäure (148).

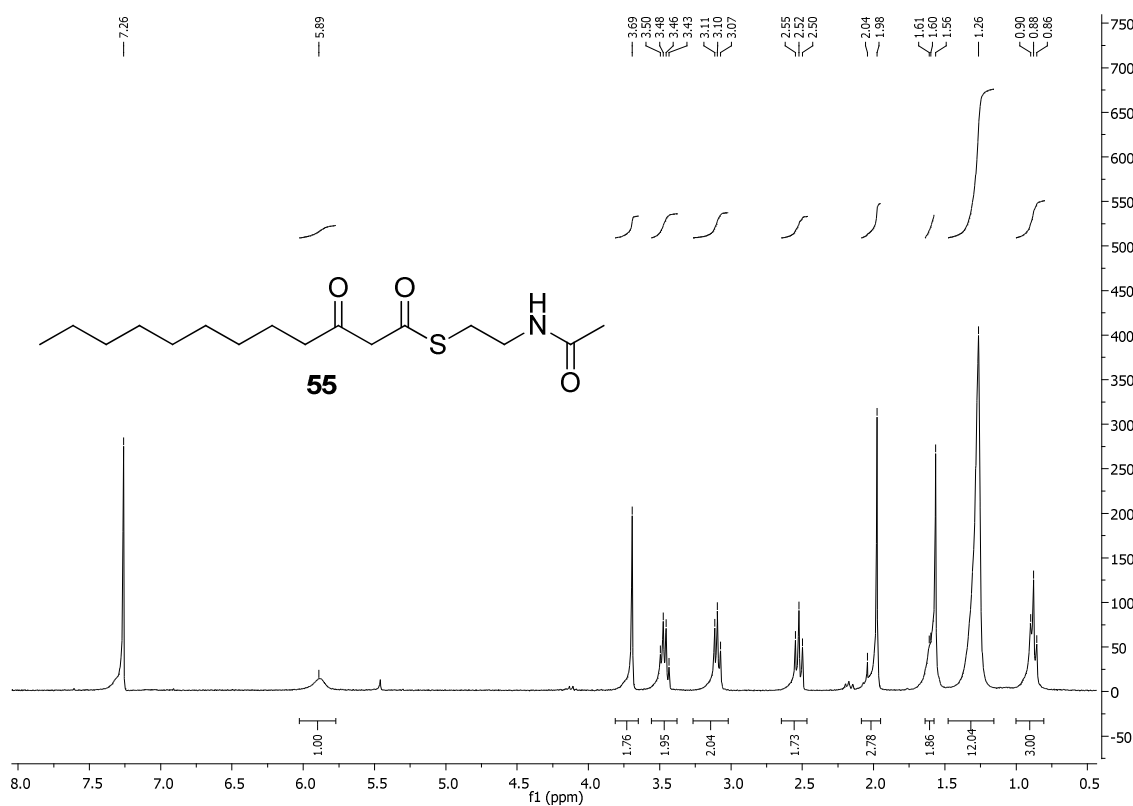


Abbildung 217: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz) von S-(2-Acetamidoethyl)-2-(2-nonyl-1,3-dioxolan-2-yl)ethanthioat (55).

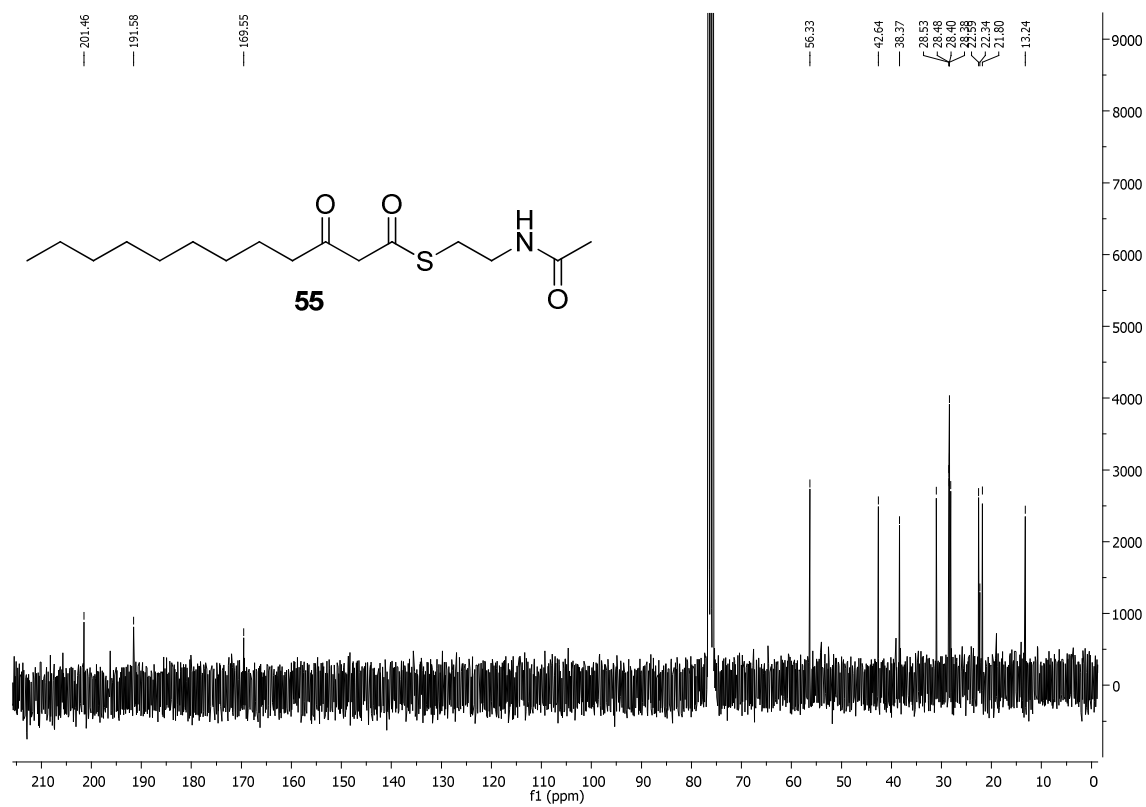


Abbildung 218: ¹H-NMR Spektrum (CDCl₃, 100 MHz) von S-(2-Acetamidoethyl)-2-(2-nonyl-1,3-dioxolan-2-yl)ethanthioat (**55**).

6.2 Vektoren und Konstrukte

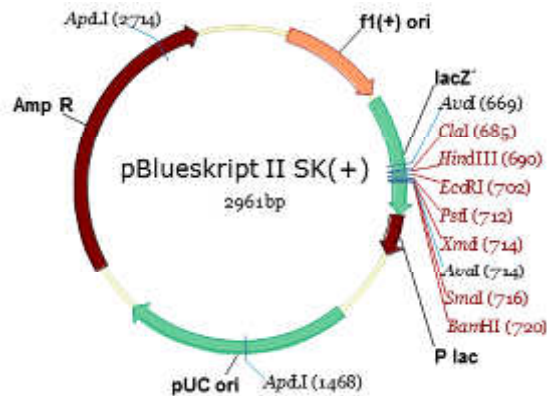


Abbildung 219: Vektorkarte des Vektors pBlueskript II SK(+).

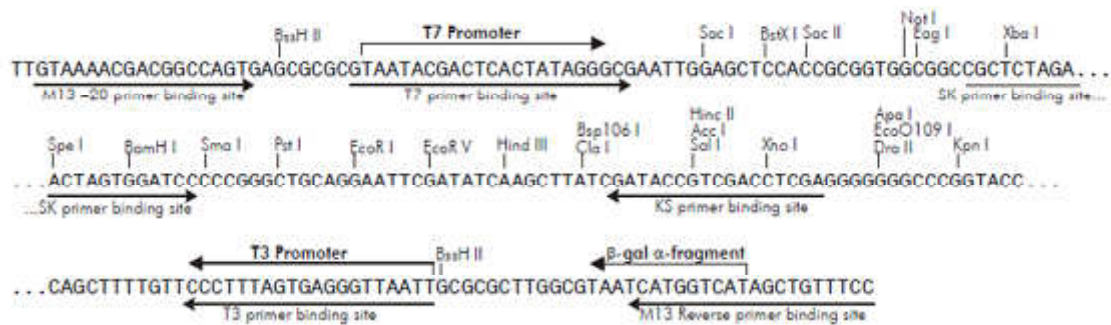


Abbildung 220: Plasmidkarte und MCS für den pBlueskript II SK(+/-) Vektor.

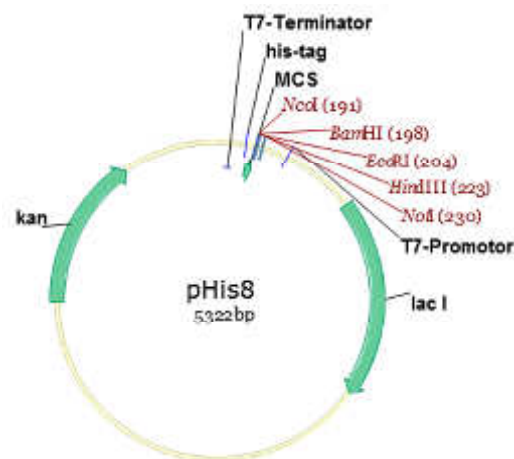


Abbildung 221: Vektorkarte des pHis8 Vektors; MCS:multiple cloning site des Vektors.



Abbildung 222: Multiple cloning site des pHis8 Vektors.

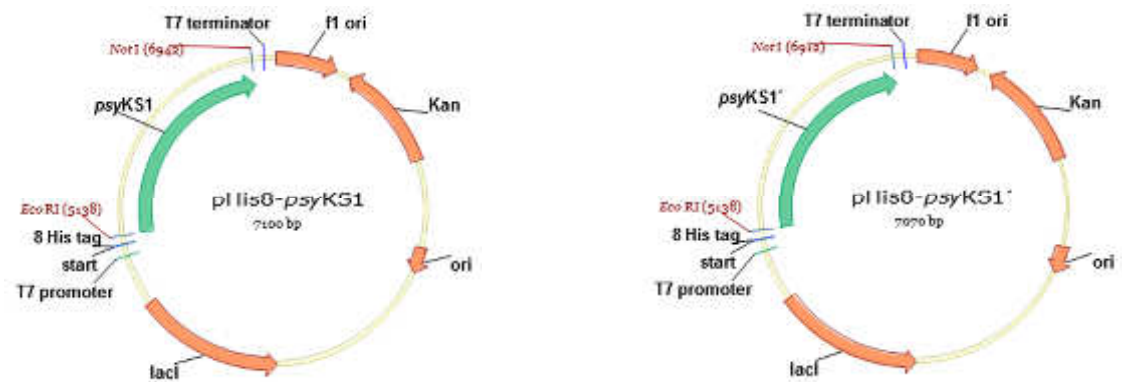


Abbildung 223: Vektorkarte der Konstrukte pSF10 und pSF11; MCS: multiple cloning site.

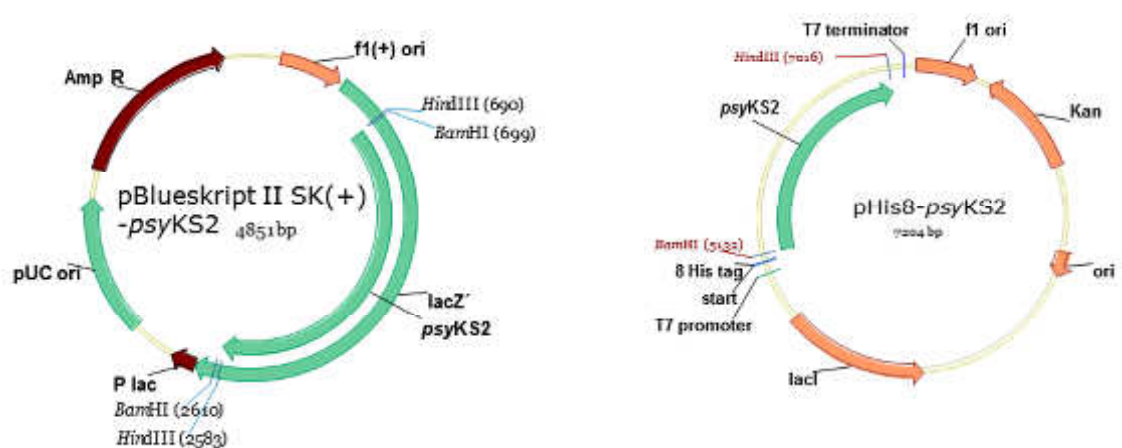


Abbildung 224: Vektorkarte der Konstrukte pSF3 und pSF7; MCS: multiple cloning site.

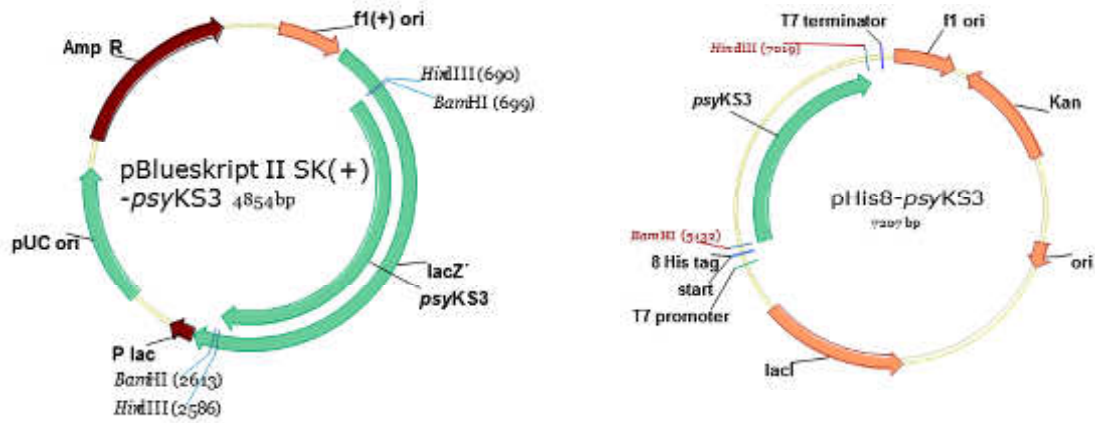


Abbildung 225: Vektorkarte der Konstrukte pSF4 und pSF8/9; MCS: multiple cloning site.

KS1:

Mkhhhhhhhhggglvprgshggsefpstkgrevivdqsaraekgvaivgmacrlpggittpealwtvlaegrdivgtvpga
rwvwpqetgpehgdpgidcggflddiarfdaklfrispreakvmdpqqrllelawsafedagyskdavegtktgvfvgas
gsdyrlleqhrvniepvmgtgtavavlpnrisyffdlqgpsllidtacssslvaiheavqalragsceqalvgginimchpam
tlayykagmlspdgrcktfdaeangyvrsegaivmmlkplsaaqrdgdriyavvkgasacnhggqaggltpnpqqqtall
raawasarvtpdqlgyleahgtgtslgdpievkgmqdafradnniaaattcylgsvksnlghleaaagiaglmklalclyhr
qlvsslvhvtvnpklgleqtpfqiaqqvmawptlksgqpsltgvssfgsggtnahvvvegveqvvgparaerpvvirlsapnv
eqlaiyarclrdylqglperarpplsalayttsrrqpmavsasywardeaslvs gladiaaglvtsvgegrglsggegpvialpg
ypfaetsfwfdkpeaqaaparpakvaledpvviarrglgivsdvltrs*

KS1':

mkhhhhhhhhggglvprgshggsefdqsaraekgvaivgmacrlpggittpealwtvlaegrdivgtvpagrwvwpqet
gpehgdpgidcggflddiarfdaklfrispreakvmdpqqrllelawsafedagyskdavegtktgvfvgasgsdyrlleq
hrvniepvmgtgtavavlpnrisyffdlqgpsllidtacssslvaiheavqalragsceqalvgginimchpamtlayykag
mlspdgrcktfdaeangyvrsegaivmmlkplsaaqrdgdriyavvkgasacnhggqaggltpnpqqqtallraawasar
vtpdqlgyleahgtgtslgdpievkgmqdafradnniaaattcylgsvksnlghleaaagiaglmklalclyhrqlvsslvhvt
vnpklgleqtpfqiaqqvmawptlksgqpsltgvssfgsggtnahvvvegveqvvgparaerpvvirlsapnveqlaiyarcl
rdylqglperarpplsalayttsrrqpmavsasywardeaslvs gladiaaglvtsveeerglsfgegpvialpgypfaetsfwf
dkpeaqaaparpakvaledpvviarrglgivsdvltrs*

KS2:

mkhhhhhhhhggglvprgshggsepsrvemaasivevktssddapisdvegdm paiavigmsgqfpqannvealwqnlv
egrdcisevpldrwpvdayfdtpqvpqgktyrwmgvledadkfdplffsispreaamdpqqrlfletcwscedag

apsslsgrcgvfagcgvsdynqhldadgl daqrfgmgstsilaarisye lnrgpsmavdtacsaslvaiavacdnlvagac
 dtalaggvcvmagpamhimtsqarm lspdgrcftfdqrangfvpg egvgvllkrladaerdgdrilgvlrwg vgnqdgk
 tngitapsqdsqtlqr dverygidpatiqlveahgtgklgd pieveglcqafssftdqrnycalgsaks nighllmaagva
 gliktlalqhqlp pti hfeqlne hialddsafyvndrirp wasqgatpraa vssfgfsgtnahvvveeyatdarrshsraagp
 flvvlsakqkerlreavqrlcdhlaahpdasiadlaytlqvgr damiervglvascddlmqqladfldgrasgwrqgtvgkg
 eqavvdatgadeatlrawasgaridwsglyp detrptrlslptypfarerywacaalp ggealegdwtlqplstd*

KS3:

mkhhhhhhhhhgglvprgshggsqrlwiedk mrd aqggsagpepiaivglsgmfpqcsdvrafwraldadqalleelptr
 fpwr dwydatgenpdksrskvggflpdiasfdprffgvl pddaarm dprqrlll mavyhaledagidagsl kksrtgvfva
 gedneyaqvlreaevldgdgfaqaanmlanqisyffdfagp semintmcsggavalhravsalrarevelavvgaanvilr
 pepfvqlsrakqlsttatvrsfgegadghlraegvasvllkplraaeaagdriyavikhsavnyngqggmsiaapfvqshqev
 iracydeakvdprevg yieaqgmgnpvadlaewhacnnalramaqqgvalpkgncrvsslkpmlghmestsafgalf
 kiirsfqthtvhqivgfakpnpel vveqqpcrlmaatepwpagpvprlagl haygiggnnahllveeyrdvrrpvrdeesgs
 ewvvl sartkdr lqavarw laddmehdqphladvaytlqtgresmreraafiahsiadlrakllavaegttgeg llygsvaprs
 rsrqaaeqaidpseawytlgrrwv dgdviawdqarpadsaqrialpgypfeqrrcwfeapppv esgdadqapnklidl*

7. Publikationen

M. Jenner, S. Frank, A. Kampa, C. Kohlhaas, P. Pöplau, G. S. Briggs, J. Piel, N. J. Oldham: Substrate specificity in ketosynthase domains from *trans*-AT polyketide synthases, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 1143-1147.

K. Jensen, H. Niederkrüger, K. Zimmermann, A. L. Vagstad, J. Moldenhauer, N. Brendel, S. Frank, P. Pöplau, C. Kohlhaas, C. A. Townsend, M. Oldiges, C. Hertweck, J. Piel: Polyketide proofreading by an acyltransferase-like enzyme, *Chem. Biol.* **2012**, 19, 329-339.

P. Pöplau, S. Frank, B. I. Morinaka, J. Piel: An enzymatic domain for cyclic ether formation in complex polyketides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 13215-13218.

Posterpräsentationen:

C. Kohlhaas, A. Kampa, S. Frank, M. Jenner, N. Oldham, J. Piel: Investigation of KS Domains in *trans*-AT Polyketide Synthases. International VAAM Workshop 2012, „Biology and Chemistry of Antibiotic-Producing Bacteria and Fungi“, 27.-29.11.2012, Braunschweig.

M. Jenner, S. Frank, A. Kampa, C. Kohlhaas, G. S. Briggs, J. Piel, N. J. Oldham: Determining the Specificity of Ketosynthase Domains from *trans*-AT Polyketide Synthases by Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Tolerance and Tunability. Directing Biosynthesis III, 2012, Nottingham.

M. Jenner, S. Frank, A. Kampa, C. Kohlhaas, J. Piel, N. J. Oldham: Determining the specificity of ketosynthase domains from *trans*-AT polyketide synthases using electrospray ionization-mass spectrometry: functional assignment of biosynthetic pathways. ASMS Annual Meeting, 2012, Vancouver.

K. Jensen,[†] J. Moldenhauer,[†] A. Vagstad,[‡] S. Frank,[†] H. Niederkrueger,[†] J. Kundert,[†], M. Jenner,[§] N. Oldham[§], J. Piel: Mining Megaenzymes – developing tools to release secrets of PKS specificities. SFB-Symposium, 2011, Bonn.